

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSTGRADO

Caracterización molecular de cepas clínicas de *Listeria monocytogenes* aisladas en el Hospital Madre Niño San Bartolomé de Lima durante el periodo 2001-2005

TESIS

para optar el grado de Magíster en Microbiología

AUTOR

Miguel Villegas Chiroque

ASESORA

Amparo Zavaleta Pesantes

Lima - Perú

2010

A mi compañera de siempre, Nella

Por su comprensión y tolerancia

Por su cariño e infinito amor

A mis padres y a mis hermanos

Por todas sus enseñanzas

Por todo su apoyo

AGRADECIMIENTO

- A la Dra. Amparo Zavaleta Pesantes del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, por su consejo permanente y apoyo incondicional en desarrollo y culminación de la presente investigación.
- Al TM Javier Soto Pastrana del Laboratorio de Microbiología y al Dr. Nazario Silva del servicio de Epidemiología del Hospital San Bartolomé por las facilidades brindadas en la realización del este estudio.
- Al Dr. José María Guevara Duncan del IMT Daniel Alcides Carrión de la UNMSM y al Dr. Guy Carbajal Carranza de la Facultad de Ingeniería Ambiental de la UNI por su valiosa ayuda bibliográfica.
- A todos los alumnos de pre y post grado del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM que de una u otra manera colaboraron en la realización de esta tesis.

ÍNDICE

	<u>pág.</u>
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
I. INTRODUCCIÓN	8
II. OBJETIVOS	9
III. MARCO TEÓRICO	
3.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	10
3.2. Listeriosis perinatal.....	23
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1. Casos y cepas clínicas.....	31
4.2. Caracterización fenotípica.....	31
4.3. Caracterización genotípica.....	35
V. RESULTADOS	
5.1. Aislamiento de cepas de <i>L. monocytogenes</i>	39

5.2. Caracterización fenotípica de cepas de <i>L. monocytogenes</i>	40
5.3. Caracterización molecular de cepas de <i>L. monocytogenes</i>	40
 VI. DISCUSIÓN	 53
 VII. CONCLUSIONES	 59
 VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 60
 ANEXOS	
Anexo 1. Abreviaturas.....	78
Anexo 2. Ficha clínico-epidemiológica.....	79
Anexo 3. Medios de cultivo.....	80
Anexo 4. Api <i>Listeria</i> ®.....	86
Anexo 5. Galería fotográfica.....	88

RESUMEN

El presente estudio se realizó con la finalidad de caracterizar cepas clínicas de *Listeria monocytogenes* aisladas en el Hospital San Bartolomé de Lima- Perú durante los años 2001 a 2005. Durante el periodo del estudio, se identificaron 18 casos de listeriosis perinatal, de los cuales fueron aisladas 20 cepas de *L. monocytogenes*. Las cepas fueron caracterizadas mediante pruebas convencionales y técnicas de biología molecular. Las 20 cepas en estudio fueron identificadas mediante las características fenotípicas conocidas de *L. monocytogenes*, tales como presencia de β -hemólisis incompleta, reacción de Christhie, Atkins y Munch-Peterson positiva con *S. aureus* y negativa con *R. equi*, así como la utilización de carbohidratos como D-glucosa y L-ramnosa, pero no de D-xilosa ni D-manitol. Todas las cepas fueron confirmadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa y tipificadas por la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). Con los cebadores OMP-01 y PJ108 se obtuvieron 6 RAPD tipos, distribuidas así: ocho cepas del tipo A-I, tres de cada uno de los tipos A-II, A-III y B-II, dos del tipo B-I y una del tipo A-IV. Se concluye que, en los 18 casos de listeriosis se obtuvieron 20 cepas de *L. monocytogenes* con seis genotipos diferentes, siendo el RAPD tipo A-I el más frecuente (8/20, 40%) entre las cepas estudiadas.

PALABRAS CLAVES: *Listeria monocytogenes*, listeriosis perinatal, PCR, RAPD.

ABSTRACT

This study was conducted in order to characterize strains of *Listeria monocytogenes* isolates from the San Bartolome's Hospital in Lima-Peru during the years from 2001 to 2005. During the study period, we identified 18 cases of perinatal listeriosis, which were isolated 20 strains of *L. monocytogenes*. The strains were characterized by conventional tests and molecular biology techniques. The 20 strains studied were identified by known phenotypic characteristics of *L. monocytogenes*, such as the presence of incomplete β -hemolysis, positive CAMP reaction with *S. aureus* and negative CAMP reaction with *R. equi*, and the use of carbohydrates as D-glucose and L-rhamnose but not from D-xylose or D-mannitol. The strains of *L. monocytogenes* were confirmed by polymerase chain reaction and typed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. With the primers OMP-01 and PJ108 were obtained six RAPD types, distributed as follows: eight strains of type AI, three of each type A-II, A-III and B-II, two type B-I and one strain of type A-IV. We conclude that, in 18 cases of listeriosis were obtained 20 strains of *L. monocytogenes* with six different genotypes, RAPD type A-I being the most frequent (8/20, 40%) among the studied strains.

KEY WORDS: *Listeria monocytogenes*, perinatal listeriosis, PCR, RAPD.

I. INTRODUCCIÓN

La listeriosis es una enfermedad producida por la bacteria *Listeria monocytogenes*, se transmite por alimentos contaminados y afecta principalmente gestantes, neonatos y otras personas inmunosuprimidas. Las listerias son bacilos Gram positivos, aerobios o anaerobios facultativos y crecen a diferente temperatura, pH y concentración salina.

La magnitud de la listeriosis en el país no se conoce por falta de vigilancia adecuada. Las publicaciones locales existentes se limitan al reporte de casos clínicos o al aislamiento de listerias a partir de alimentos. Sin embargo, en los grandes hospitales de Lima, principalmente en los materno infantiles, se presentan pacientes con infección por *L. monocytogenes* que no se notifican regularmente.

El Hospital San Bartolomé de Lima es un establecimiento de salud materno infantil de referencia nacional, su misión es brindar servicios de salud especializados de alta calidad y de carácter integral dirigidos a la mujer, al neonato, al niño y al adolescente. Este nosocomio atiende cerca de cien mil pacientes por año, asiste más de 6 mil partos por año y en las décadas pasadas reportó algunos casos de listeriosis perinatal.

En Perú, no existen investigaciones a nivel molecular de *L. monocytogenes* de origen clínico. Ante esta situación, se realizó el presente estudio con la finalidad de identificar y caracterizar cepas de *L. monocytogenes* aisladas del Hospital San Bartolomé durante los años 2001 a 2005, mediante métodos bacteriológicos convencionales y técnicas de biología molecular, como son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Identificar y caracterizar molecularmente cepas clínicas de *L. monocytogenes* aisladas del Hospital Madre Niño San Bartolomé de Lima durante el período 2001-2005.

2.2. Objetivos específicos

- a. Aislar cepas de *L. monocytogenes* de muestras procedentes de casos perinatales atendidos en el Hospital Madre Niño San Bartolomé entre los años 2001 a 2005.
- b. Caracterizar las cepas clínicas aisladas de *L. monocytogenes* mediante técnicas bacteriológicas convencionales.
- c. Caracterizar molecularmente las cepas clínicas de *L. monocytogenes* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).

III. MARCO TEÓRICO

3.1. *Listeria monocytogenes*

3.1.1. Antecedentes

En Europa, casos de listeriosis y aislamiento de listerias fueron informados desde fines del siglo XIX y comienzos del siglo XX. Las primeras descripciones corresponden a Hayem (Francia, 1891) y Henle (Alemania, 1893). El primer aislamiento bacteriano se atribuye a Dumont y Coloni (Francia, 1921), pero se reconoce oficialmente a Murray y colaboradores como descubridores de *L. monocytogenes* en Cambridge (Inglaterra, 1924). El primer caso de listeriosis en humanos se atribuye al reportado por Nyfeldt (Dinamarca, 1929)¹⁻⁵.

En Perú, Geldres⁶ en 1957 publicó el primer aislamiento de *L. monocytogenes* de origen animal. Pereda y colaboradores⁷ en 1963 describieron el primer caso de listeriosis humana. Pereda⁸ en 1977 describió 20 casos de listeriosis perinatal identificados de autopsias realizadas en la Maternidad de Lima. Guevara y colaboradores⁹ en 1979 publicaron una serie de 17 casos de dos hospitales de Lima, donde señalan 8 casos perinatales e incluyen 7 cepas aisladas a partir de 653 muestras de heces (4 de *L. monocytogenes* y 3 de *L. innocua*).

Desde entonces, las publicaciones en Perú se han circunscrito en documentar casos clínicos esporádicos de listeriosis humana o al aislamiento de listerias a partir de alimentos contaminados, como ceviche, pollos, verduras y productos lácteos¹⁰⁻²².

Por otro lado, en 1983 Kary Mullis desarrolló la técnica de amplificación del ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a la cual

rápidamente se buscó aplicación en diversos campos de la ciencia^{23,24}. En 1990, Williams y colaboradores describieron una variante de la PCR, donde utilizaron cebadores cortos de secuencia arbitraria, la denominaron ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y utilizaron para identificar y tipificar animales, vegetales y microorganismos diversos^{25,26}.

Lawrence y colaboradores²⁷ usaron la técnica RAPD para tipificar 91 cepas de *L. monocytogenes* (serotipos 4b, 1/2a, 1/2b y 1/2c) procedentes de alimentos, leche, ambientales y clínicos. Los investigadores emplearon un cebador con 10 nucleótidos de secuencia arbitraria para amplificar el ADN bacteriano en condiciones de baja rigurosidad. Los productos amplificados presentaron perfiles con 1-10 bandas de tamaño entre 0,5-5 Kb, con lo que observaron 33 RAPD tipos. Los autores consideraron que la técnica es sencilla, rápida y valiosa por su alto poder discriminatorio.

Czajka y coautores²⁸ emplearon el método RAPD para verificar la relación causal entre las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de los alimentos sospechosos y las cepas obtenidas de pacientes en cuatro brotes de listeriosis ocurridos en Estados Unidos entre 1981 y 1989. Los autores confirmaron la similitud entre los patrones de banda de las cepas de alimentos y sus correspondientes cepas clínicas. Los investigadores resaltaron la capacidad de la técnica RAPD para discriminar entre cepas de iguales tipos obtenidos por electroforesis enzimática multilocus.

Kerouanton y colaboradores²⁹ compararon 5 sistemas de tipificación utilizados en el estudio epidemiológico de *L. monocytogenes*, como son: serotipificación, tipificación enzimática, ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), ribotipificación y electroforesis en gel de campo pulsátil (PFGE). En 35 cepas epidémicas y no epidémicas de *L. monocytogenes* identificaron 3 serotipos (4b, 1/2a, 1/2c), 8 zimotipos, 13 RAPD tipos, 10 ribotipos y 12 PFGE tipos. Los autores concluyeron que la técnica RAPD es un método sencillo, rápido y efectivo para la discriminación de cepas e identificación de clones de *L. monocytogenes*.

Estrada y Zavaleta^{21,22} aislaron 4 cepas (8%) de *L. monocytogenes* en 50 muestras de leche cruda procedente de establos de Lima. La identificación de cepas aisladas de *L. monocytogenes* lo realizaron con métodos bacteriológicos convencionales y mediante la amplificación del gen *iap* en la PCR. Entre las cepas identificadas, con la técnica RAPD observaron tres genotipos de *L. monocytogenes* obtenidos según el análisis de los perfiles de banda de los productos amplificados.

3.1.2.Taxonomía y nomenclatura

En 1924, Murray y colaboradores identificaron una nueva bacteria, agente etiológico de un brote de sepsis y monocitosis en animales de laboratorio, la denominan *Bacterium monocytogenes*. En 1927, Pirie aisló una bacteria semejante del hígado de ratones, la llamó *Listerella hepatolytica* en honor al Dr. Joseph Lister, pionero de la bacteriología y antisepsia. No obstante, un grupo de mohos había adoptado el nombre de *Listerella*, por lo que se propuso cambiar a *Listeria*, término aceptado por la Comisión Judicial de Nomenclatura y Taxonomía Bacteriológica en 1940¹⁻⁵.

La bacteria en mención adoptó diversos nombres a través de la historia, como *Bacillus hepatis* (Hulphers, 1911), *Bacterium monocytogenes* (Murray *et al*, 1926), *Listerella hepatolytica* (Pirie, 1927), *Listerella monocytogenes hominis* (Nyfeldt, 1932), *Corynebacterium parvulum* (Schultz *et al*, 1934), *Listerella ovis* (Gill, 1937), *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940), *Erysipelothrix monocytogenes* (Wilson y Miles, 1946), *Corynebacterium infantisepticum* (Potel, 1950) y *Listeria infantisepticum* (Stack, 1953)^{3, 7}.

El género *Listeria* pertenece al grupo de bacterias Gram positivas no formadoras de esporas, de morfología regular y bajo contenido G+C (37-39%), estrechamente relacionado al género *Brochothrix*. Comprende seis especies: *L.*

monocytogenes (1940), *L. grayi* (1966), *L. ivanovii* (1984), *L. innocua* (1983), *L. seeligeri* (1983) y *L. welshimeri* (1983). Los antiguos serovares 5 y 6 de *L. monocytogenes*, ahora corresponden a *L. ivanovii* (antes *L. bulgarica*, 1975) y *L. innocua* respectivamente. Otras dos antiguas especies, como son *L. denitrificans* (1961) y *L. murrayi* (1971), han sido reclasificadas en otros géneros^{4, 5}.

Desde el punto de vista filogenético, las listerias advierten dos ramas evolutivas: una constituida por la especie *L. grayi* y la otra que incluye al resto de especies. Esta última rama, se distribuye en dos grupos: el primero formado por *L. monocytogenes* y *L. innocua*, y el segundo, por *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*^{9,30,31}.

3.1.3. Características microbiológicas

Las listerias son bacilos Gram positivos que miden entre 0,5 a 2 µm de longitud por 0,5 µm de diámetro, no forman esporas y son aerobios o anaerobios facultativos. Presentan flagelos peritricos y tienen motilidad; así, exhiben un característico movimiento en bamboleo en medios líquidos y forman un “paraguas” en medios semisólidos a temperatura del ambiente (de 20 a 25 °C). Usualmente se consideran no capsulados y al microscopio se observan semejantes a las corinebacterias y otros diplococos Gram positivos^{4,32-39}.

Se desarrollan en amplio rango de pH (de 5,0 a 9,0) y de temperatura (de 1 a 45 °C), son halotolerantes (5-45 g/L de NaCl) y crecen en múltiples medios de cultivo. Cuando se requiere aislar *Listeria sp* en muestras procedentes de sitios estériles, sólo se necesita medios convencionales, como por ejemplo: agar sangre, agar chocolate, agar tripticasa soya, agar infusión cerebro corazón o agar Müeller Hinton. No obstante, en muestras procedentes de zonas contaminadas con bacterias de crecimiento rápido, se necesita enriquecimiento en frío y el uso de

medios selectivos, tales como: caldo FDA, caldo USDA, caldo ISO, caldo UVM, agar McBride, agar LPM, agar PALCAM u agar Oxford^{4,40-42}.

En agar sangre de carnero al 5%, *L. monocytogenes* forma colonias pequeñas y redondas, de 0,3 a 2 mm, ligeramente elevadas, de aspecto transparente y color grisáceo, con fina textura de superficie y estrecho halo de hemólisis beta (β -hemólisis incompleta). La prueba de hemólisis sinérgica o reacción de CAMP (Christhie, Atkins y Munch-Peterson) es positiva con la β -toxina de *Staphylococcus aureus* y negativa con la exotoxina de *Rhodococcus equi*^{37,43,44}.

La actividad hemolítica de *L. monocytogenes* se demuestra sobre agar sangre de carnero, vaca, caballo, conejo y humano. La hemólisis se asocia con patogenicidad y virulencia; sin embargo, la magnitud de hemólisis entre especies no se relaciona con la patogenicidad; así, se observa cepas no patógenas de *L. ivanovii* con halos hemolíticos mayores que colonias patógenas de *L. monocytogenes*. La magnitud de la hemólisis se debe a la presencia de factores bacterianos como las hemolisinas y fosfolipasas^{3,4,37}.

El agar tripticasa soya es un excelente sustrato para el cultivo y preservación de listerias, además es transparente e incoloro, lo que permite visualizar colonias de *L. monocytogenes* de color gris-azulado y, a través del método de transiluminación oblicua de Henry, colonias de color azul-verdoso. Características semejantes se pueden observar sobre agar McBride y agar LPM (litio, feniletanol y moxalactam), pero no sobre agar Oxford y PALCAM (polimixina, acriflavina, litio, ceftazidime, esculina y manitol), donde se observan colonias con halos oscuros debido a la degradación de la esculina³⁷⁻³⁹.

Las colonias de *Listeria sp* presentan reacción positiva a la prueba de catalasa, pero tienen reacción negativa a la oxidasa. Las reacciones con rojo de metilo y Voges-Proskauer son también positivas. Además, hidrolizan la esculina

y fermentan algunos carbohidratos produciendo ácido, pero no gas. La mayor cantidad de cepas de *L. monocytogenes* fermenta la glucosa, lactosa, ramnosa y manosa, pero no actúan sobre la xilosa, manitol, ni almidón. Las listerias no reducen nitratos, ni producen indol, ni hidrolizan la urea (producen amonio a partir de la arginina) y tampoco degradan la gelatina³⁷⁻³⁹.

La tipificación y subtipificación de listerias se realiza mediante pruebas serológicas, tipificación por fagos, electroforesis enzimática y mediante técnicas moleculares. La serotipificación en base a los antígenos bacterianos somático (O) y flagelar (H) es la técnica convencional estándar en la tipificación de listerias. Así, se describen cerca de 15 serotipos de *L. monocytogenes*; no obstante, la mayoría de las infecciones en humanos corresponden sólo a tres serotipos (4b, 1/2a y 1/2b); por lo tanto, la serotipificación que no contribuye significativamente en la ámbito clínico, ni aporta mayor información en el estudio de brotes³⁷⁻³⁹.

3.1.4. Caracterización molecular

Las técnicas moleculares se emplean en la identificación, tipificación y subtipificación de bacterias y otros microorganismos. Las estrategias metodológicas de tipificación molecular son principalmente tres, a saber: a) el análisis de macrorestricción por electroforesis en gel de campo pulsátil (PFGE), método estándar en la tipificación de diversos microorganismos; b) el análisis de southern blot, como la ribotipificación; y c) el análisis del polimorfismo del ADN cromosómico a través de la PCR. En este último grupo metodológico, figuran: 1) el polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), 2) el polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y 3) el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)⁴⁵⁻⁵⁰.

La preferencia por uno u otro método depende de los resultados o productos que se desea obtener y de las características particulares de cada técnica, como son tipeabilidad, reproducibilidad, estabilidad, poder

discriminatorio, concordancia epidemiológica y versatilidad. El costo y la disponibilidad de los equipos y reactivos son también aspectos importantes al momento de la elección. Además, la rapidez con que se requieren de los resultados es fundamental, por ejemplo durante la investigación de un brote epidémico^{24,47}.

En la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) no se requiere del conocimiento previo del segmento de ADN que se va amplificar. Es un método sencillo, fácil, rápido y de bajo costo. La técnica utiliza cebadores cortos de 8-12 nucleótidos, de secuencia arbitraria y composición de G+C entre el 50 y 80%. Estos cebadores son capaces de detectar y amplificar polimorfismos de ADN genómicos, los cuales expresados como bandas separadas por electroforesis funcionan como marcadores genéticos. La principal limitación de la técnica RAPD es su baja reproducibilidad porque es muy sensible a pequeñas variaciones metodológicas⁵¹⁻⁵³.

El RAPD es una variante de la PCR, donde amplificación se realiza en condiciones de baja rigurosidad (temperatura de hibridación de 36 a 45°C y concentración de cloruro de magnesio mayor a 2 mM). En los ciclos iniciales, el cebador arbitrario e inespecífico se une al genoma en múltiples secuencias con homología parcial y los fragmentos obtenidos son el resultado de pequeñas porciones de ADN flanqueados por copias del cebador⁵⁰. En los ciclos posteriores, se obtiene un conjunto importante y específico de segmentos de ADN amplificado de diversos tamaños. Finalmente, el perfil de bandas de ADN obtenidas por electroforesis es fácil de interpretar⁵¹⁻⁵³.

Los diversos métodos moleculares de tipificación y subtipificación de *L. monocytogenes* han resultado en agrupar a la bacteria en dos grandes linajes o divisiones filogenéticas: la primera división agrupa los serotipos 4b y 1/2b principalmente y la segunda, incluye frecuentemente a los serotipos 1/2a y 1/2c. Algunos autores señalan una tercera división o linaje que contiene al serotipo 4a,

pero otros investigadores consideran que se trata de una rama de la primera división filogenética⁵⁴⁻⁵⁷.

3.1.5. Ciclo de vida intracelular

L. monocytogenes es un patógeno intracelular facultativo y actúa como un germen oportunista. Su peculiar ciclo de vida, facilita su multiplicación y diseminación célula a célula, sin contacto al medio extracelular, a través de los siguientes pasos (fig.1):

1) Adhesión e internalización. Las internalinas bacterianas (Inl A e Inl B) reconocen a sus receptores específicos en la célula huésped (E-cadherinas) e inician su ingreso mediante una clásica fagocitosis. Sin embargo, los fagocitos no profesionales, como las células epiteliales, utilizan un mecanismo tipo cremallera (“zipper”) para englobar las bacterias⁵⁸⁻⁶⁰.

2) Ruptura del fagolisosoma primario. Las listerias fagocitadas quedan incluidas dentro de la vacuola lisosomal (fagolisosoma primario). En este medio ácido y con concentración baja de hierro, las bacterias secretan la listeriolisina O, una hemolisina que degrada el colesterol de la pared vacuolar. La hemolisina se fija sobre el colesterol presente en la membrana del fagolisosoma, lo digiere y provoca la liberación de las listerias al citoplasma, lugar donde se multiplican y rápidamente proliferan⁵⁸⁻⁶⁰.

3) Polimerización de actina. En el citoplasma de la célula huésped, la proteína bacteriana Act A promueve la formación de un material electrodensito de actina que rodea las listerias. Así, la actina de la célula huésped se condensa de manera asimétrica y forma una “cola de cometa” que favorece la motilidad intracitoplasmática de las listerias. Las bacterias migran por propulsión centrífuga en busca de una célula adyacente⁵⁸⁻⁶¹.

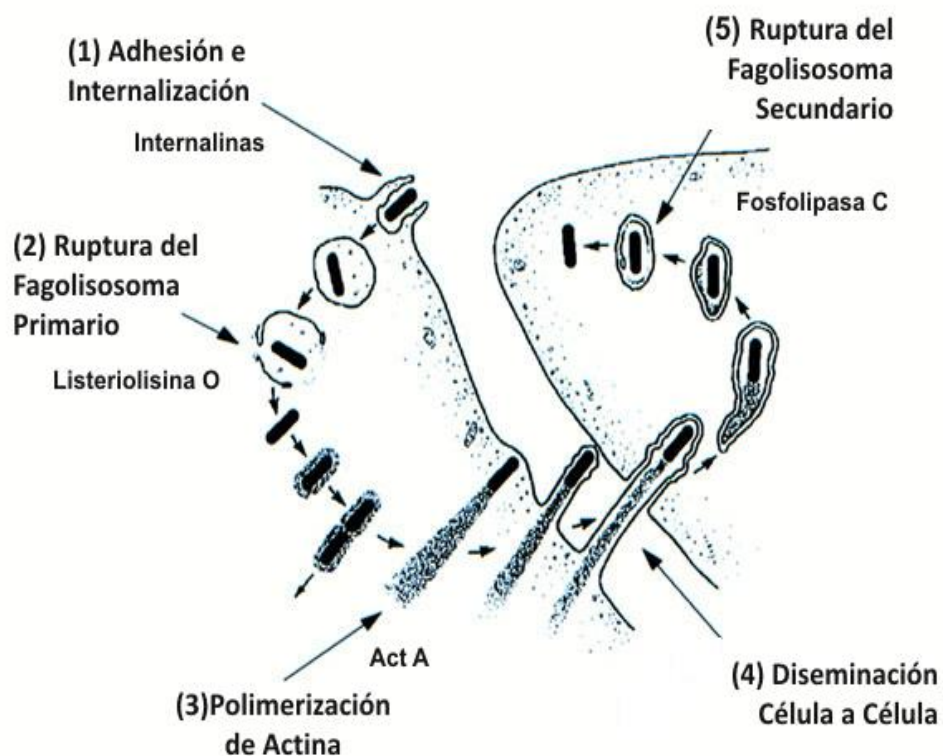


Figura N° 1. Ciclo biológico de *L. monocytogenes*

(Adaptado de Cossart, Portnoy y Lecuit⁵⁸⁻⁶⁰)

4) Diseminación célula a célula. Por efecto de la migración bacteriana se producen proyecciones (filopodias) hacia una célula huésped contigua. Las filopodias, que contienen las listerias, al ser ingeridas por la célula adyacente forman una nueva vacuola lisosomal de doble membrana (fagolisosoma secundario)⁵⁸⁻⁶⁰.

5) Ruptura del fagolisosoma secundario. Las listerias secretan una lecitinasa (fosfolipasa C) para digerir la doble membrana de la vacuola secundaria. Otra vez, las bacterias alcanzan el citoplasma de una nueva célula huésped y reinician el ciclo de invasión⁵⁸⁻⁶⁰.

3.1.6. Factores de virulencia

En 1941, Harvey y Faber señalaron la producción de una hemolisina soluble por *L. monocytogenes*. Desde entonces, diversas sustancias se han considerado como factores de virulencia, entre los cuales destacan: internalinas, listeriolisina O, fosfolipasas C, proteína Act A, entre otras más.

Los factores de virulencia de *L. monocytogenes* están codificados por genes agrupados en los islotes de patogenicidad. El islote de patogenicidad de *Listeria* tipo 1 (LPI-1) es controlado por el factor regulador positivo A (*prfA*). El regulón *prfA* contiene los 6 principales genes de la virulencia, divididos en tres grupos: el monocistrón *hly*, el operón lecitinasa (*mpl*, *actA* y *plcB*) y el operón *plcA-prfA* (fig. 2). El gen *hly* codifica la listeriolisina O, los genes *plcA* y *plcB* codifican las fosfolipasas C respectivas; mientras que, los genes *mpl*, *actA* y *prfA* codifican sus proteínas correspondientes^{5, 62-65}.

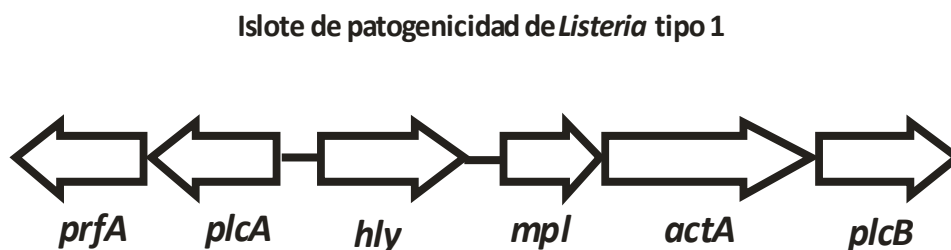


Figura N° 2. Genes de virulencia de *L. monocytogenes*

(Adaptado de Torres¹ *et al* y Vásquez-Boland *et al*⁵)

a) Internalinas. Son proteínas de superficie cuya estructura molecular presenta regiones LRR (repeticiones ricas en leucina) en su extremo N-terminal. Interactúan con receptores celulares específicos (E-cadherinas) para facilitar su ingreso o internalización a la célula huésped. Se han identificado 8 clases de internalinas, pero las mejor caracterizadas son la internalina A y la internalina B. La internalina A consta de 800 aminoácidos con 15 regiones LRR y la internalina B contiene 630 aminoácidos con 7 regiones LRR. Ambas se codifican en el operón *inl AB* presente en el Islote de Patogenicidad de *Listeria* tipo 2 (LIPI-2) del cromosoma bacteriano⁶⁶⁻⁷⁰.

La E-cadherina es una glucoproteína de adhesión intercelular dependiente de calcio, se expresa en diversas células de mamíferos (enterocitos, hepatocitos, células M, células dendríticas y células endoteliales) y constituye el receptor de la internalina A. El receptor de internalina B no se ha identificado, pero se conoce que contiene el sitio catalítico de una tirosinocinasa⁶⁶⁻⁷⁰.

b) Listeriolisina O. Es una proteína de 52 KDa, integrante del grupo de toxinas dependientes de colesterol (CDTx), las cuales típicamente conservan el undecapéptido en su región C-terminal con un residuo de cisteína que le confiere capacidad de formar puentes disulfuro con otras moléculas. La Listeriolisina O es una hemolisina producida por *L. monocytogenes* que se correlaciona con su patogenicidad. Otras dos especies de *Listeria* también producen hemolisinas CDTx, como ivanolisina (de *L. ivanovii*) y seeligerilisina (de *L. seeligeri*). La sustitución de alanina por fenilalanina en el undecapéptido de la seeligerilisina, explica la inocuidad de *L. seeligeri*, a pesar de su importante actividad hemolítica *in vitro*⁷¹⁻⁷³.

La listeriolisina O se activa a pH ácido (de 4,5 a 6,5) y baja concentración de hierro. Esta hemolisina actúa sobre el colesterol de la membrana vacuolar primaria, provocando su ruptura y liberación de listerias al citoplasma, además facilita la acción de las fosfolipasas C en la digestión de la vacuola secundaria. En el citoplasma, la listeriolisina O es inactivada por enzimas que reconocen su

secuencia N-terminal de 29 aminoácidos, semejante a la secuencia PEST de las proteínas humanas, para evitar el daño ulterior de membranas⁷¹⁻⁷³.

c) Fosfolipasas C. Son un grupo heterogéneo de enzimas (EC: 3.1.4.3) que actúan sobre la cabeza polar de los fosfolípidos, a nivel del enlace fosfodiéster formado entre el 1,2-diácil-glicerol y el grupo fosfatidil. En las listerias y otros microorganismos, son factores de virulencia que tienen acción directa sobre las membranas y en forma indirecta, a través de sus productos metabólicos, como inductores de la polimerización actínica, segundos mensajeros e iniciadores de eventos catalíticos⁷⁴⁻⁸¹.

En 1962, Fuzi y Pillis describieron la actividad lecitinasa de las listerias, al observar reacciones de opacidad sobre agar yema de huevo en correlación con la intensidad de hemólisis. *L. monocytogenes* produce dos tipos de fosfolipasa C: una tipo A, específica para fosfatidil-inositol y otra tipo B, lecitinasa de amplio espectro. Un tercer tipo de fosfolipasa C, capaz de hidrolizar la esfingomielina, se encuentra en *L. ivanovi*⁷⁴⁻⁸¹.

La fosfolipasa C tipo B es una proteasa dependiente de zinc de 29-30 KDa con actividad lecitinasa y hemolítica en amplio rango de pH (de 5 a 8). Tiene amplio espectro de sustratos (fosfatidil-colina > fosfatidil-etanolamina > fosfatidilserina > esfingomielina >> fosfatidil-inositol). Es secretada como una proenzima de 33 KDa, la cual se activa con la metaloproteasa listerial Mpl y una proteasa lisosomal de cisteína de la célula huésped⁷⁴⁻⁸¹.

La fosfolipasa C tipo A es un polipéptido de 33 KDa que actúa a pH de 5,5 a 7,5. En bacterias, esta fosfolipasa es específica para fosfatidil-inositol y genera residuos monofosforilados (inositol-1,2-monofosfato-cíclico). La fosfolipasa C tipo A o fosfatidilinositol sinergiza con la listeriolisina O para digerir la membrana del fagolisosoma primario; mientras que, la fosfolipasa C tipo B o lecitinasa de amplio espectro actúa principalmente sobre la doble membrana del fagolisosoma secundario⁷⁴⁻⁸¹.

d) Proteína Act A. Es una proteína bacteriana de superficie, semejante a las proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto. En su forma madura contiene 610 aminoácidos divididos en tres dominios: N-terminal (1-233), región central rica en prolina (234-395aa) y C-terminal (396-610)^{61, 82-90}.

La proteína Act A induce la formación de polímeros de actina (G→F) en el citoesqueleto de la célula huésped. Las proteínas de unión entre la actina de la célula huésped y la proteína bacteriana Act A son profilina, complejo Arp2/3 y proteína estimulante de vasodilatación (VASP). La polimerización de actina incluye los pasos de nucleación, elongación e intercambio, y se desarrolla de manera asimétrica, formando una “cola de cometa” que transporta las listerias mediante propulsión en dirección polar hacia una célula adyacente. Este particular mecanismo de motilidad intracelular permite que las listerias migren y alcancen las células adyacentes para diseminarse de célula en célula⁸²⁻⁹⁰.

e) Proteína p60. Es una proteína extracelular de 60 KDa con actividad hidrolasa de la mureína, involucrada en la formación del septum durante la división celular y responsable de la invasión listerial en fagocitos no profesionales. La proteína p60 se obtiene de mutantes rugosas de *L. monocytogenes* con capacidad invasiva y constituye el antígeno principal en la respuesta de protección frente a *L. monocytogenes*. El gen *iap* codifica la proteína asociada a invasión p60 y es un gen de control post-transcripcional, independiente del regulón *prfA* del LIPI-1^{62,63}.

f) Proteasas Clp. Las proteínas caseinolíticas (Clp) son ATP-ases relacionadas con la proteína del shock térmico-100 (Familia HSP-100 /Clp) que actúan como moduladores frente a cambios ambientales de pH, temperatura y osmolaridad. Muchas proteínas caseinolíticas asociadas a cepas virulentas de *L. monocytogenes* (Clp C, Clp E y Clp P) constituyen mediadores de la respuesta al stress^{62,63}.

3.2. LISTERIOSIS PERINATAL

3.2.1. Definición

La listeriosis perinatal se refiere a la enfermedad infecciosa ocasionada por *L. monocytogenes* que afecta a la mujer gestante (listeriosis durante el embarazo), al feto y al recién nacido (listeriosis fetal y neonatal).^{1-5, 32.36.} *L. monocytogenes* es la principal especie patógena para el hombre y los animales. Otras especies de *Listeria* pueden ocasionar enfermedad humana solo de manera excepcional^{91,92}.

3.2.2. Epidemiología

La listeriosis es una enfermedad que se presenta en brotes epidémicos o en forma esporádica. En brotes epidémicos se manifiesta como una gastroenteritis febril y se relacionada al consumo de alimentos contaminados. En forma esporádica, se presenta como sepsis, meningoencefalitis o localizada en algún órgano, como artritis, peritonitis, hepatitis, pleuritis, endoftalmitis u osteomielitis.

La enfermedad afecta principalmente a recién nacidos, gestantes, ancianos e inmunosuprimidos con cáncer, trasplantes, corticoterapia, infección VIH /SIDA, insuficiencia renal crónica, diabetes mellitus, cirrosis hepática, lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades debilitantes⁹³⁻¹⁰⁶.

a) Distribución e incidencia. Las listerias son bacterias ubicuas, ampliamente distribuidos en la naturaleza, viven en forma saprofita en el suelo, polvo ambiental, estiércol, desagües, agua dulce y salada, vegetales en descomposición y contamina diversos alimentos. Colonizan el intestino de los animales como peces, crustáceos, aves y mamíferos, incluido al hombre.

Diversos brotes epidémicos y casos esporádicos de listeriosis se han registrado en todas partes del mundo. En Estados Unidos, la incidencia anual de

listeriosis se estima en 7 casos por millón de habitantes y su letalidad entre el 20 y 70%; mientras que, en Europa, la incidencia anual por millón de habitantes varía desde 1,6 en Noruega hasta 14,7 en Francia¹⁰⁷⁻¹¹⁵.

Las mujeres embarazadas y sus recién nacidos tienen 17 veces mayor riesgo de desarrollar listeriosis y representan la tercera parte de los casos reportados¹¹⁶⁻¹²⁰.

b) Reservorios /portadores. El huésped animal es el reservorio natural primario de la listeriosis. Los rumiantes domésticos, tales como ganado ovino, caprino y bovino, adquieren la infección en brotes epizooticos, algunos desarrollan enfermedad grave (meningoencefalitis o abortos), pero otros se mantienen portadores y transportan cepas virulentas en sus intestinos. El hombre también puede transportar listerias en los intestinos y actuar como reservorio secundario^{121,122}.

c) Modo de transmisión. La listeriosis es una infección transmitida vía fecal-oral por la ingesta de alimentos contaminados. Los animales portadores eliminan en sus excretas listerias patógenas que contaminan los alimentos, y éstos al ser ingeridos ocasionan enfermedad en un huésped susceptible. La mastitis que desarrollan algunos animales, como vacas y cabras, favorecen la contaminación de la leche y sus derivados.

Los vehículos de transmisión son alimentos contaminados, como por ejemplo en un brote epidémico de listeriosis en Canadá (1981) se determinó que la ensalada de col fue el vehículo de transmisión. En Italia (1993 y 1997) se asoció con la ingesta de arroz y maíz, en Suecia (1995) de pescado ahumado y en Francia (1992) de carne de cerdo. En los Estados Unidos, se atribuyó al consumo de leche chocolatada, queso tipo mexicano, carne, embutidos y mariscos en los brotes de Massachussets (1983), Los Angeles (1985), Connecticut (1989), Illinois (1994), Carolina del Norte (2000) y Nueva York (2000) respectivamente. El agua no se ha implicado en ninguno de los brotes reportados¹⁰⁴⁻¹¹².

La transmisión materno-fetal de listerias puede suceder durante todo período de gestación y durante el parto. Las listerias tienen tropismo por el útero grávido, invaden la placenta y cruzan la barrera placentaria hasta alcanzar al feto. Durante el parto, las listerias se pueden adquirir por aspiración y/o deglución de los fluidos maternos contaminados por el recién nacido, como líquido cervicovaginal, líquido amniótico, meconio y sangre. Después del parto, puede ocurrir contaminación cruzada de una fuente infectada a través del personal de salud o de la madre¹²²⁻¹²⁶.

El contagio directo de listerias puede ocasionar dermatitis o conjuntivitis, y ocurre particularmente durante accidentes ocupacionales entre veterinarios o manipuladores de alimentos^{4, 5}.

3.2.3. Patogenia

Las listerias tienen bajo potencial de patogenicidad. La dosis mínima infectante por vía oral no está definida y depende de la susceptibilidad del huésped. En los pacientes, las bacterias se detectan en altas concentraciones (10^6); pero en los alimentos implicados, se recupera en bajas concentraciones (10^2 - 10^4). La gastroenteritis ocurre a las 24 horas post-ingesta del alimento contaminado y la enfermedad séptica se desarrolla 20 a 30 días después¹²⁷⁻¹²⁹.

L. monocytogenes tiene capacidad de invadir células epiteliales de las vellosidades intestinales y pasar rápidamente a los macrófagos del estroma adyacente. La invasión epitelial no requiere de multiplicación bacteriana local y ocurre sin lesionar la mucosa. Otra ruta, menos eficaz, es la invasión de células M de las placas de Peyer, al igual que otros patógenos entéricos. La interacción entre linfocitos y enterocitos genera producción de IL-15, citoquina importante en la defensa local. Las listerias viajan por vía sanguínea o linfática hasta alcanzar los

ganglios mesentéricos, y posteriormente, el hígado y el bazo. La traslocación bacteriana a órganos profundos es pasiva, dosis dependiente y no específica^{127,129}.

En el hígado y el bazo, los macrófagos residentes capturan las listerias de la circulación. Entonces, las bacterias llegan a los hepatocitos por diseminación célula a célula desde las células de Kupffer o por invasión directa, después de cruzar la barrera endotelial fenestrada de los sinusoides. El hepatocito es el principal sitio de multiplicación bacteriana, donde las listerias desarrollan su ciclo biológico completo. Al inicio, se producen microabscesos debido al reclutamiento de neutrófilos en el parénquima hepático, pero después son remplazados por macrófagos y linfocitos, formando verdaderos granulomas¹²⁷⁻¹²⁹.

La respuesta celular inmune contra epítopes bacterianos específicos logra controlar y erradicar las listerias; no obstante, si la inmunidad esta comprometida, es incompleta o está disminuida se produce proliferación y diseminación multisistémica de listerias con tropismo predilecto al sistema nervioso central o útero grávido, si hay gestación en curso⁵ (fig. 3).

La invasión cerebral es consecuencia de la bacteriemia producida, las listerias invaden las células endoteliales y cruzan la barrera hemato encefálica. Además, se postula la invasión directa a través de la mucosa respiratoria y afectación centripeta de los nervios craneales. A diferencia de otros gérmenes, las listerias no solo afectan las meninges, si no también el parénquima cerebral, sobretodo el romboencéfalo, provocando meningitis, encefalitis y abscesos¹³⁰⁻¹³².

En el útero grávido, las listerias invaden la decidua basal y las vellosidades de la placenta, forman microabscesos, vellositis focal necrotizante, y finalmente, alcanzan al feto ocasionándole compromiso multiorgánico. La placentitis y corioamnionitis pueden conllevar al aborto espontáneo, óbito fetal o recién nacido infectado, pero la gestante casi nunca se complica con meningoencefalitis o enfermedad grave. El impacto de la infección al feto o recién nacido es grave en

la mayoría de casos, pero la enfermedad en la madre es de curso transitorio y se resuelve con el término del embarazo y/o tratamiento adecuado¹²³⁻¹²⁶.

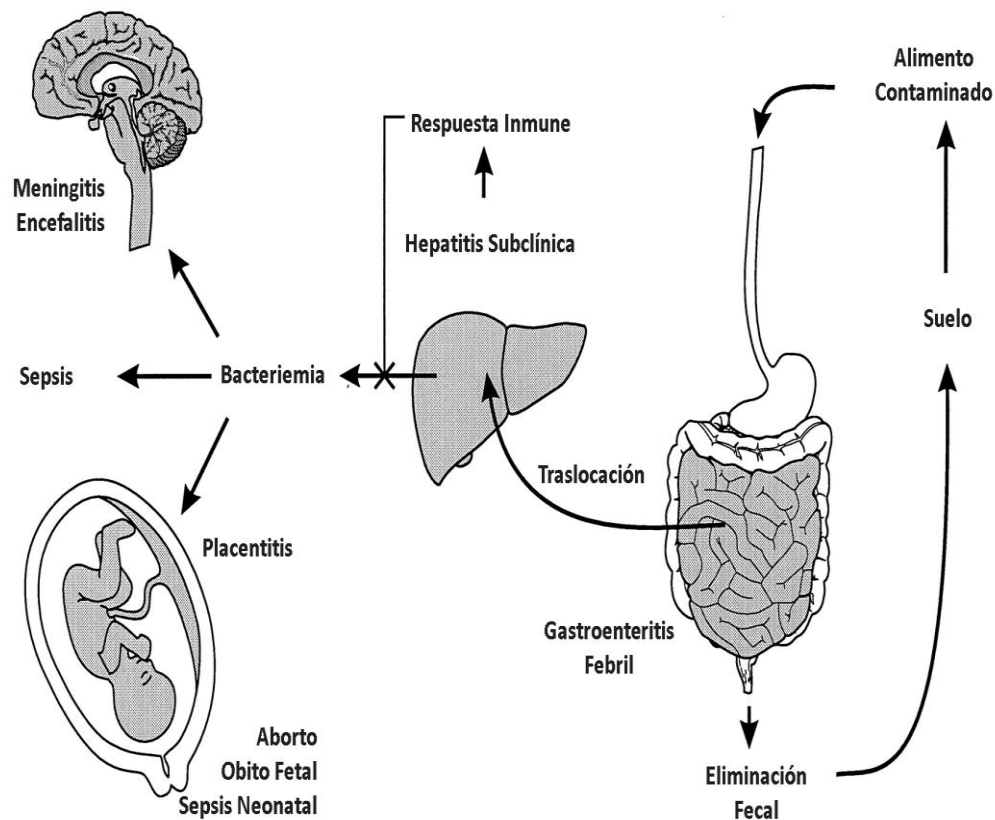


Figura N° 3. Patogenia de la listeriosis humana

(Adaptado de Vásquez-Boland *et al*⁵)

La susceptibilidad de la listeriosis durante el embarazo está bien documentada, aunque poco se conoce cómo la gestación predispone a ello. La disminución de la inmunidad celular es el factor clave y la barrera maternofoetal, el factor crítico. El embarazo transcurre con depresión de la inmunidad celular (Th_1 mayor que Th_2), así la respuesta Th_1 (regulada por $IFN-\gamma$ y $FNT-\alpha$), deletérea para el embarazo e importante contra patógenos intracelulares, está muy disminuida.

La placenta humana (discoide, multivellosa y hemomonocorial) que conforma la barrera materno-fetal, contiene células trofoblásticas y amnióticas que expresan E-cadherina, el receptor de la internalina A¹³³⁻¹³⁹.

La interacción entre Internalina A y E-cadherina es especie específica. La prolina en la posición 16 de la E-cadherina está presente en las especies permisivas (humanos, cobayo, ovino, bovino), mientras que el ácido glutámico reemplaza a la prolina en las especies no permisivas (ratas, saurios). Los estudios experimentales señalan que la proteína bacteriana Act A, responsable de polimerización de actina, facilita la migración intracitoplasmática y diseminación célula a célula de las listerias. Esta proteína juega un rol importante en la invasión placentaria de listerias y su posterior pase al feto¹⁴⁰⁻¹⁴⁶.

3.2.4. Manifestaciones clínicas

La listeriosis durante el embarazo ocurre por lo común durante el tercer trimestre, pero puede ocurrir en cualquier momento de la gestación. La enfermedad cursa como un cuadro pseudogripal o de gastroenteritis febril, su evolución es benigna y casi nunca complica con sepsis o meningoencefalitis. Los principales síntomas son fiebre, dolor de espalda, lumbalgia, dolor abdominal, náuseas-vómitos, diarreas, cefalea, mialgias y dolor de garganta, por lo que puede confundirse con resfrío común, faringitis, gastroenteritis o pielonefritis¹⁴⁷⁻¹⁵⁴.

Los factores que determinan la sintomatología y severidad de la enfermedad son: virulencia de la cepa, tamaño del inóculo y estado de inmunidad del huésped. Los serotipos 1/2a y 1/2b de *L. monocytogenes* se relacionan con los brotes alimentarios, mientras que el serotipo 4b se asocia a enfermedad invasiva^{5,34}.

La gestante con listeriosis que no recibe tratamiento antibiótico adecuado puede desarrollar placentitis, amnióntis e infección fetal. La infección adquirida

durante el primer trimestre del embarazo, por lo general terminan con la pérdida del feto en aborto espontáneo. La listeriosis durante el segundo trimestre puede conllevar al óbito fetal, parto prematuro y recién nacidos de muy bajo peso. Durante el último trimestre, la infección afecta al neonato¹⁵⁵⁻¹⁶¹.

La listeriosis neonatal incluye dos formas de presentación clínica. Una precoz de inicio temprano que ocurre durante la primera semana de producido el parto y otra de presentación tardía que ocurre después de la semana del nacimiento. Entre ambas formas de presentación clínica, hay diferencias respecto al mecanismo de contagio, gravedad y pronóstico de la enfermedad^{124,161}.

La listeriosis neonatal temprana ocurre durante la primera semana de vida del recién nacido. En forma clásica, se presenta como granulomatosis infantiséptica, caracterizado por la formación de abscesos, tipo granulomas, en múltiples órganos, como hígado, bazo, pulmones, riñones, cerebro y piel. También, el neonato puede desarrollar sepsis, neumonía, distress respiratorio o ictericia del recién nacido. La meningitis es poco frecuente, pero el niño puede estar letárgico. Todas estas formas clínicas son muy graves, la tasa de letalidad es del 20 al 50%. La infección se adquiere por vía transplacentaria y, por lo general, desencadena en parto prematuro^{124,161}.

La listeriosis neonatal tardía, ocurre por lo común entre la segunda y tercera semana después del nacimiento, en forma de septicemia y meningoencefalitis, igual a otros patógenos bacterianos. Se presenta irritabilidad, letargia, dificultad para succionar y alimentarse, hay signos de irritación meníngea. El pronóstico también es malo, la tasa de letalidad es del 10 al 20%. Por lo general, ocurre en niños a término de apariencia saludable, quienes adquieren la infección durante o después de ocurrido el parto^{124, 161}.

En gestantes, las listerias se recuperan de sangre, secreción cervicovaginal, placenta, líquido amniótico, leche materna y, en forma excepcional, de orina y líquido cefalorraquídeo. En recién nacidos, se aíslan listerias de sangre y líquido

cefalorraquídeo, muy raro de secreción conjuntival y lesiones de piel. Las listerias también se pueden recuperar de las lesiones granulomatosas de órganos internos afectados en óbitos fetales y natimueitos^{5, 124}.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. CASOS Y CEPAS CLÍNICAS

En los registros médicos de las Salas de Hospitalización y Laboratorio de Microbiología se identificaron de manera retrospectiva un total de 52 casos con sospecha clínica de listeriosis perinatal ocurridos entre enero del 2001 y diciembre del 2005 en el Hospital Madre Niño San Bartolomé de Lima. Sin embargo, fueron excluidos 34 casos por las siguientes razones: en 21 no se logró identificar gérmenes en los cultivos tomados, en ocho se aisló una bacteria diferente a *Listeria sp*, en dos se aisló *Listeria sp* y otra bacteria, en dos se identificó *Listeria sp* pero no se encontró el historial clínico respectivo y en uno se perdió al aislado de *Listeria sp*.

Por ello, en esta investigación se consideraron solo 18 casos de listeriosis perinatal confirmados con cultivos positivos para *Listeria sp*, de los cuales en 16 casos se aisló una cepa de *Listeria sp* por cada caso, pero en dos casos se aisló dos cepas por caso; por tanto, se obtuvieron 20 cepas de *Listeria sp*.

Se revisaron los historiales clínicos de los casos confirmados de listeriosis perinatal (madres y recién nacidos) y se registró la información de mayor relevancia en una ficha clínico epidemiológica elaborada para tal fin (anexo 2).

4.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

En el Laboratorio de Microbiología del Hospital Madre Niño San Bartolomé se realizó el cultivo de cepas de *Listeria sp* sobre agar sangre de

carnero al 5 % y agar tripticasa soya (TSA)^{*}, incubados a 37 °C por 24 a 48 horas en condiciones de aerobiosis. Las colonias obtenidas se utilizaron para la identificación bacteriana de género y especie.

4.2.1. Identificación del género *Listeria*

La identificación de *Listeria sp* (cuadro n° 1) se realizó mediante las siguientes pruebas de laboratorio:

a. Tinción de Gram. Se realizaron tinciones de Gram con la técnica habitual para evaluar las características microscópicas sobre la morfología bacteriana de las cepas en estudio.

b. Catalasa. Se agregó peróxido de hidrógeno al 3% en una pequeña muestra de cultivo bacteriano en agar TSA colocada sobre una lámina portaobjetos. Se evaluó la formación de burbujas en la mezcla como parámetro de positividad de la reacción de la catalasa.

c. Motilidad. Cada cepa bacteriana se sembró por puntura en tubos conteniendo agar motilidad e incubó a 37 °C por 24 a 48 horas y a temperatura ambiente (de 20 a 25 °C) por 5 días. La motilidad bacteriana se determinó por la formación del “paraguas” bajo la superficie del medio.

d. Rojo de metilo y Voges-Proskauer. Se agregó y mezcló tres gotas de reactivos rojo de metilo y Voges Proskauer (α -naftol +KOH) en tubos con cultivos en caldo RM-VP, incubados a 37 °C por 2 a 5 días. Las reacciones positivas se evidenciaron por el viraje al color rojo.

^{*} La composición y preparación de medios de cultivo empleados se describen en el anexo n° 3.

e. Tolerancia al NaCl. Cada cepa, se sembró en caldo NaCl al 6,5% e incubó a 37 °C por 48 horas. El viraje del medio al color amarillo se utilizó como parámetro de la tolerancia bacteriana al medio salino.

f.- Crecimiento sobre agar bilis esculina. Se sembró cada cepa en agar bilis esculina e incubó a 37 °C por 48 horas. El oscurecimiento del medio se empleó como indicador de utilización de esculina.

Cuadro N° 1. Características diferenciales del género *Listeria*

BACTERIAS GRAM POSITIVAS	Tinción de Gram	Utilización de O ₂	Prueba de Catalasa	Prueba de Motilidad	Reacción de RM/VP	Producción de H ₂ S en TSI	Tolerancia al NaCl 6,5%	Bilis Esculina	Hidrólisis de Glucosa
<i>Listeria sp</i>	BG+	F	+	+	+	-	+	+	+
<i>Brochotrix</i>	BG+	F	+	-	-	-	-	-	+
<i>Erysipelothrix</i>	BG+	F	-	-	-	+	-	-	+
<i>Lactobacillus</i>	BG+	F	-	-	-	-	-	-	+
<i>Kurthia</i>	BG+	E	+	+	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i>	BG+	F	+	-	-	-	-	-	+
<i>Streptococcus</i>	CG+	F	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i>	CG+	F	-	-	-	-	+	+	-

BG+, bacilos Gram positivos; CG+, cocos Gram positivos; F, aerobiosis o anaerobiosis facultativa; E, aerobiosis estricta. Adaptado de las referencias 21 y 40.

4.2.2. Identificación de *L. monocytogenes*

La identificación de *L. monocytogenes* (cuadro n° 2) se realizó mediante las siguientes pruebas diferenciales:

a. β -Hemólisis. Se sembró cada cepa bacteriana sobre agar sangre de carnero al 5% e incubó a 37 °C por 24 a 48 horas. Se evaluó el crecimiento de las

colonias obtenidas según distribución, forma, aspecto, color, tamaño y presencia o no de hemólisis.

b. Reacción de CAMP. En placas con agar sangre de carnero al 5%, se sembraron por estría en línea recta, una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y otra de *Rhodococcus equi* ATCC 6939. En ambas placas, se inocularon en forma transversal las cepas en estudio, separadas de 1 a 2 mm., luego se incubaron a 37 °C por 24 a 48 horas. La reacción de CAMP se evaluó mediante la potenciación o no de hemólisis producida por *S. aureus* o *R. equi* sobre las cepas en estudio.

c. Utilización de carbohidratos. Cada cepa, se inoculó sobre tubos con caldo fermentación de carbohidratos al 0,5% de D-glucosa, L-ramnosa, D-xilosa y D-manitol, luego incubó a 37 °C por 7 días. La utilización específica de cada carbohidrato por fermentación se determinó mediante el viraje del color púrpura del medio al color amarillo, indicando la acidificación del medio.

Cuadro N° 2. Características diferenciales de *Listeria monocytogenes*

ESPECIES DE <i>LISTERIA</i>	B-HEMÓLISIS	REACCIÓN DE CAMP		FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS				
		<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	D-Glucosa	D-Manitol	D-Xilosa	L-Ramnosa	α-metil-D-Mannosido
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	+	-	-	v*	+
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	+	-	+	v	+
<i>L. grayi</i>	-	-	-	+	+	-	-	-

V, variable (10-90% de cepas pueden ser positivas). Adaptado de las referencias 21 y 40.

d.- API Listeria. Se realizó API *Listeria*® (Laboratorios BioMérieux), según las indicaciones del fabricante (anexo 4), cuando hubo hallazgos inconsistentes o dudosos en los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales. El sistema API *Listeria*® utiliza un set estandarizado de 10 pruebas bioquímicas (test de DIM, esculina, α -manosidasa, D-arabitol, D-xilosa, L-ramnosa, α -metil-D-glucósido, D-ribosa, glucosa-1-fosfato y D-tagatosa) para la identificación diferencial de cepas de listerias^{162,163}.

4.3. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

Las cepas de *L. monocytogenes* se sembraron sobre agar TSA para su transporte al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, lugar donde se realizaron las pruebas moleculares.

4.3.1. Extracción y purificación del ADN genómico^{21,164}

Se realizaron cultivos líquidos de *L. monocytogenes* en caldo tripticasa soya con extracto de levadura al 0,6% e incubó a 37 °C por 18 horas, luego se centrifugaron las células a 5000 rpm por 5 minutos y se lavaron de dos a tres veces con buffer salino fosfato. Cada pellet se resuspendió en buffer de extracción Tris-NaCl-EDTA y lisozima, e incubó a 37 °C por 2 horas. Se agregó SDS al 1% y proteinasa K (100 μ g /mL) e incubó a 50 °C durante 12 horas.

El ADN se extrajo con igual volumen de fenol-cloroformo (1:1), se precipitó con 0,1 volumen de acetato de sodio 3M y un volumen de isopropanol y se centrifugó a 1200 rpm por 5 minutos. Se lavó con etanol al 70% y se secó a

temperatura ambiente por 30 minutos. El pellet de ADN se resuspendió en 50 μ L de buffer Tris 10 mM-EDTA 1 mM y se guardó a 4 °C.

El ADN purificado se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer Tris-Acetato-EDTA 1X a 80 V por una hora. La concentración del ADN se determinó por comparación con cantidades conocidas del marcador de peso molecular fago lambda / *Hind* III.

4.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa^{21, 22}

Se utilizó un par de cebadores diseñados a partir del gen *iap*¹⁶⁵ específicos para identificar *L. monocytogenes*, cuya secuencia de nucleótidos se describe a continuación:

- Mono A: 5'-CAAACCTGCTAACACAGCTACT-3'
- Lis1B: 5'-TTATACGCGACCGAAGCCAAC-3'

El volumen final de la reacción fue de 50 μ L, conteniendo buffer 1X; MgCl₂ 1,5 mM; desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) 200 μ M de cada uno, enzima *Taq* ADN polimerasa 1U, cebadores 20 μ mol de cada uno, y ADN genómico 100 ng.

La amplificación del ADN se realizó en el termociclador Perkin Elmer 2400. Las condiciones de la PCR fueron:

- a) Desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos.
- b) 35 ciclos de:
 - Desnaturalización a 94 °C por 45 segundos.
 - Hibridación a 55 °C por un minuto.
 - Extensión a 72 °C por 45 segundos.
- c) Un ciclo final de extensión de 72 °C por 7 minutos.

Se utilizaron controles de ADN positivo (*L. monocytogenes* ATCC 19118) y negativo (*E. coli* ATCC 43887).

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando buffer Tris-Borato-EDTA 1X a 80 V durante una hora. Se utilizó el marcador de peso molecular ladder 1 Kb.

4.3.3. ADN polimórfico amplificado al azar²²

Se emplearon cinco cebadores de secuencia arbitraria y tamaño variable que se detallan en el cuadro n° 3.

Cuadro N° 3. Cebadores utilizados en el RAPD

Nombre Cebador	Secuencia (5' → 3')	N° de bases	T Hib. (°C)	Referencias bibliográficas
OMP-01	CTTGGTGGCT	10	36	27, 166, 167
M132	GAGGGTGGCGGTTCT	15	50	22, 168
PJ118	TGTTTCGTGCTGTTTCTG	17	50	22, 169
PJ108	GCTTATTCTTGACATCCA	18	50	22, 169
M13	GTTGTAAAACGACGGCCAGT	20	50	22, 170

El volumen final de la reacción fue de 50 µL conteniendo buffer 1X; MgCl₂ 2,5 mM; dNTP 200 µM de cada uno; *Taq* DNA polimerasa 1U, cebador 20 pmol; y ADN genómico 50 ng.

Las condiciones de amplificación fueron semejantes a las descritas para la PCR, excepto la temperatura de hibridación que varió según el tamaño del cebador y las características del mismo (cuadro n° 3).

Los productos del RAPD fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando buffer TBE 1X. Se usó el marcador de peso molecular ladder 100 pb y 1 Kb.

Los perfiles de ADN se registraron con una cámara fotográfica polaroid y fueron analizados de manera visual. Los perfiles de ADN obtenidos en el RAPD se calificaron como idénticos o diferentes en base al número y tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos para cada cebador. Asimismo, según los perfiles de ADN observados, las cepas en estudio se agruparon en diferentes tipos.

V. RESULTADOS

5.1. Aislamiento de cepas clínicas de *L. monocytogenes*

Se estudiaron 20 cepas de *L. monocytogenes* aisladas a partir de 18 casos de listeriosis perinatal atendidos en el Hospital Madre Niño San Bartolomé de Lima entre los años 2001 y 2005 (cuadros n° 4 y 5). En el caso n° 4 se aisló una cepa del líquido amniótico de la madre y otra en la sangre de su recién nacido, cepas 4 y 4'. En el caso n° 12 se aislaron dos cepas de un mismo neonato, pero en localizaciones diferentes: una de secreción conjuntival y otra de sangre, cepas 12 y 12'.

Las pacientes de los casos de listeriosis perinatal en su mayoría son mujeres jóvenes con edad promedio de 25 años y rango de edades desde 16 años hasta 35 años. El 61% (11/18) de las madres procede de los distritos del cono norte, como son: Comas, Los Olivos, Puente Piedra, Independencia y San Juan de Lurigancho. El resto de las madres (7/18) procede del cercado de Lima y del distrito de La Victoria (cuadro n° 4 y fig.4).

Las madres implicadas en los casos de listeriosis perinatal tuvieron embarazos que conllevaron a recién nacidos vivos en su mayoría (83%, 15/18); no obstante, se registraron tres casos fatales: un aborto, un óbito fetal y un recién nacido fallecido. Es decir, el 17% (3/18) de los casos identificados de listeriosis perinatal se relacionó con pérdida del embarazo (cuadro n° 4).

De las 20 cepas clínicas de *L. monocytogenes*, cinco se aislaron en gestantes y 15 en recién nacidos. Además, se aislaron 13 cepas en muestras de sangre, tres de líquido amniótico, tres de líquido cefalorraquídeo y una de secreción conjuntival. De las cepas bacterianas obtenidas de hemocultivos, dos fueron en gestantes y 11 en recién nacidos (cuadro n° 5 y fig.5).

5.2. Caracterización fenotípica de cepas de *L. monocytogenes*

Todas las cepas de *L. monocytogenes* aisladas compartieron las mismas características fenotípicas en base a las pruebas microbiológicas convencionales descritas para esta especie (cuadro n° 6 y anexo n° 5). Así, se observó positividad en las pruebas de catalasa, motilidad y rojo de metilo/Voges Proskauer, toleraron bilis (crecimiento en agar bilis esculina) y sal (desarrollo en NaCl al 6,5%), presentaron β -hemólisis y tuvieron reacción de CAMP positiva con *Staphylococcus aureus* y negativa con *Rhodococcus equi*.

En las pruebas de fermentación de carbohidratos, las cepas de *L. monocytogenes* utilizaron D-glucosa y L-ramnosa, pero no D-manitol, ni D-xilosa. Al principio, se presentó una reacción falsa positiva para D-xilosa. Sin embargo, cuando se utilizó el sistema API *Listeria*® (BioMérieux), se demostró que las cepas no utilizaban D-xilosa (cuadro n° 6 y anexo n° 5).

5.3. Caracterización molecular de cepas de *L. monocytogenes*

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de cultivos puros y frescos de las cepas clínicas. La amplificación del ADN genómico mostró bandas únicas de alto peso molecular para todas las cepas en estudio, indicando buena calidad y pureza del ADN extraído. Las concentraciones se estimaron colocando concentraciones conocidas del ADN del fago lambda cortado con la enzima *Hind* III.

La identificación molecular de las cepas de *L. monocytogenes* se determinó mediante la visualización de los productos amplificados del gen *iap* obtenidos por PCR, utilizando cebadores para este gen. El tamaño de los productos amplificados fue aproximadamente de 660 pb (fig. 7) y en las 20 cepas se observó el mismo amplicón.

En el RAPD se utilizó cinco cebadores de secuencia arbitraria, tales como: OMP-01, M132, PJ118, PJ108 y M13. Con los cebadores M132, PJ118 y M13 se obtuvo perfiles de ADN idénticos para todas las cepas estudiadas. Así, en la fig. 8 se muestra los perfiles de ADN semejantes obtenidos con el cebador M13 que no permiten discriminación alguna. Sin embargo, con los cebadores OMP-01 y PJ108 se obtuvieron dos y cuatro perfiles de ADN respectivamente (fig. 9 y fig. 10).

En los perfiles de ADN obtenidos con los cebadores OMP-01 y PJ108 se identificaron fragmentos de ADN de tamaño variable entre 0,2 y 3 Kb aproximadamente. En base al número y tamaño de los fragmentos observados, se determinaron los denominados RAPD tipos del presente estudio (cuadro n° 6). Con el cebador OMP-01 se obtuvo dos perfiles de ADN diferentes denominados arbitrariamente A y B (fig. 9); mientras que, con el cebador PJ108 se visualizó 4 perfiles de ADN asignados como I, II, III y IV (fig. 10).

De las cepas en estudio, 15 se catalogaron dentro del tipo A y 5 como del tipo B; del mismo modo, 10 fueron consideradas dentro del tipo I, 6 del tipo II, 3 del tipo III y una del tipo IV. El cebador PJ108 permitió discriminar en cuatro grupos las cepas con perfil tipo A obtenidas con el cebador OMP-01 y en dos grupos las cepas tipo B, obteniéndose los 6 RAPD tipos correspondientes.

Los cebadores OMP-01 y PJ108 permitieron distinguir los tipos A-I, A-II, A-III, A-IV, B-I y B-II. Las cepas clínicas estudiadas están distribuidas de la siguiente manera: 8 cepas del tipo A-I; tres de los tipos A-II, A-III y B-II, dos del tipo B-I y una cepa del tipo A-4 (cuadro n° 6). El genotipo A-I fue el más frecuente (8/20, 40%).

Entre las 20 cepas de *L. monocytogenes* no se determinó relación alguna entre el RAPD tipo y el lugar de procedencia de la madre. Por ejemplo, las cepas 1, 9, 12, 12' 13, 14 y 18 que se obtuvieron de pacientes procedentes del distrito de

Comas, pertenecieron a RAPD tipos diferentes. De igual manera, las cepas 3, 4, 4', 5 y 15 que proceden de madres del Cercado de Lima pertenecieron también a RAPD tipos diferentes.

Se observó concordancia entre las cepas pareadas respecto a su RAPD tipo. Las cepas 4 y 4', materna y neonatal respectivamente, se agruparon en el RAPD tipo A-II; mientras que, las cepas 12 y 12', de secreción conjuntival del neonato y de sangre de un mismo neonato, se incluyeron al RAPD tipo A-III.

Las cepas n° 13, 14 y 15, aisladas en noviembre del 2004, presentaron todas el RAPD tipo B-II. Del mismo modo, las cepas 6 y 7, identificadas en enero del 2003, ambas presentaron el perfil de ADN correspondiente al RAPD tipo A-I.

**Cuadro N° 4. Casos clínicos de listeriosis perinatal identificados en el
Hospital Madre Niño San Bartolomé de Lima, 2001-2005**

CASO N°	GESTANTE		PRODUCTO DE LA GESTACIÓN	FECHA DE PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD
	Procedencia (Distrito)	Edad (años)		
1	Comas	19	RN vivo	Feb 2001
2	La Victoria	21	RN vivo	Jul 2001
3	Cercado	20	RN vivo	Ago 2001
4	Cercado	22	RN vivo	Oct 2001
5	Cercado	23	RN vivo	Oct 2002
6	Puente Piedra	26	Óbito Fetal	Ene 2003
7	Cercado	27	Natimuerto	Ene 2003
8	SJ Lurigancho	26	RN vivo	Feb 2003
9	Comas	35	RN vivo	Oct 2003
10	Los Olivos	26	RN vivo	Ene 2004
11	La Victoria	29	Aborto	Abr 2004
12	Comas	29	RN vivo	Jul 2004
13	Comas	22	RN vivo	Nov 2004
14	Comas	24	RN vivo	Nov 2004
15	Cercado	20	RN vivo	Nov 2004
16	Independencia	21	RN vivo	Mar 2005
17	Los Olivos	35	RN vivo	May 2005
18	Comas	16	RN vivo	Jun 2005

RN, recién nacido o neonato.

Cuadro N° 5. Cepas aisladas de *L. monocytogenes* según tipo de muestra y grupo poblacional atendido en el Hospital San Bartolomé de Lima, 2001-2005

Código CEPA	TIPO DE MUESTRA	GRUPO POBLACIONAL	FECHA DE AISLAMIENTO
1	Sangre	Neonato	10 /02 /2001
2	Sangre	Neonato	10 /07 /2001
3	Sangre	Neonato	31 /08 /2001
4	Líquido Amniótico	Gestante	11 /10 /2001
4'	Sangre	Neonato	12 /10 /2001
5	Líquido Cefalorraquídeo	Neonato	15 /10 /2002
6	Líquido Amniótico	Gestante	14 /01 /2003
7	Sangre	Neonato	13 /01 /2003
8	Sangre	Neonato	10 /02 /2003
9	Sangre	Neonato	09 /10 /2003
10	Sangre	Neonato	19 /01 /2004
11	Sangre	Gestante	23 /04 /2004
12	Secreción Conjuntival	Neonato	22 /07 /2004
12'	Sangre	Neonato	26 /07 /2004
13	Sangre	Neonato	08 /11 /2004
14	Líquido Cefalorraquídeo	Neonato	17 /11 /2004
15	Líquido Cefalorraquídeo	Neonato	18 /11 /2004
16	Sangre	Gestante	22 /03 /2005
17	Líquido Amniótico	Gestante	03 /05 /2005
18	Sangre	Neonato	10 /06 /2005

* Las cepas 4 y 4' corresponden a un mismo caso (una cepa aislada en la gestante y otra en su neonato). Las cepas 12 y 12' corresponden a un mismo caso (dos cepas del neonato, aisladas una de secreción conjuntival y otra de sangre).

Cuadro N° 6. Características microbiológicas de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas en el Hospital Madre Niño San Bartolomé de Lima, 2001-2005

Cód. CEPA	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS						CARACTERÍSTICAS MOLECULARES		
	REACCIÓN DE CAMP		FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS				PCR	RAPD tipo	
	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	D-Glucosa	D-Manitol	D-Xilosa	L-Ramnosa		OMP-01	PJ-108
1	+	-	+	-	-	+	+	A	II
2	+	-	+	-	-	+	+	A	III
3	+	-	+	-	-	+	+	A	I
4	+	-	+	-	-	+	+	A	II
4'	+	-	+	-	-	+	+	A	II
5	+	-	+	-	-	+	+	B	I
6	+	-	+	-	-	+	+	A	I
7	+	-	+	-	-	+	+	A	I
8	+	-	+	-	-	+	+	B	I
9	+	-	+	-	-	+	+	A	I
10	+	-	+	-	-	+	+	A	IV
11	+	-	+	-	-	+	+	A	I
12	+	-	+	-	-	+	+	A	III
12'	+	-	+	-	-	+	+	A	III
13	+	-	+	-	-	+	+	B	II
14	+	-	+	-	-	+	+	B	II
15	+	-	+	-	-	+	+	B	II
16	+	-	+	-	-	+	+	A	I
17	+	-	+	-	-	+	+	A	I
18	+	-	+	-	-	+	+	A	I

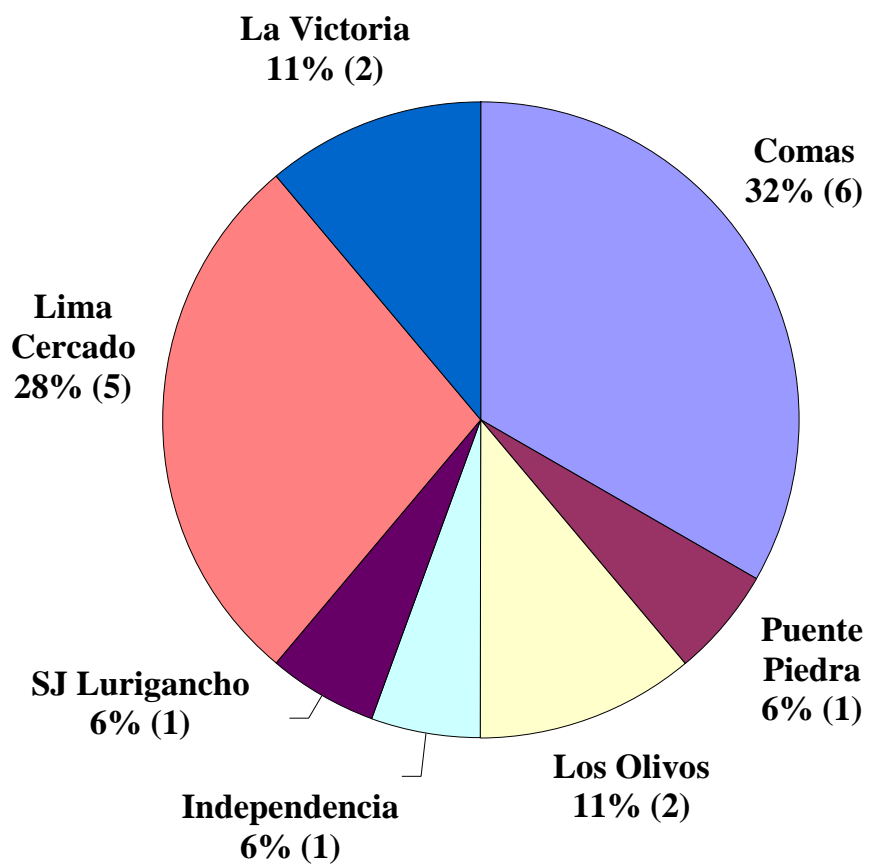


Figura N° 4. Lugar de procedencia de los casos de listeriosis perinatal atendidos en el Hospital San Bartolomé, 2001-2005

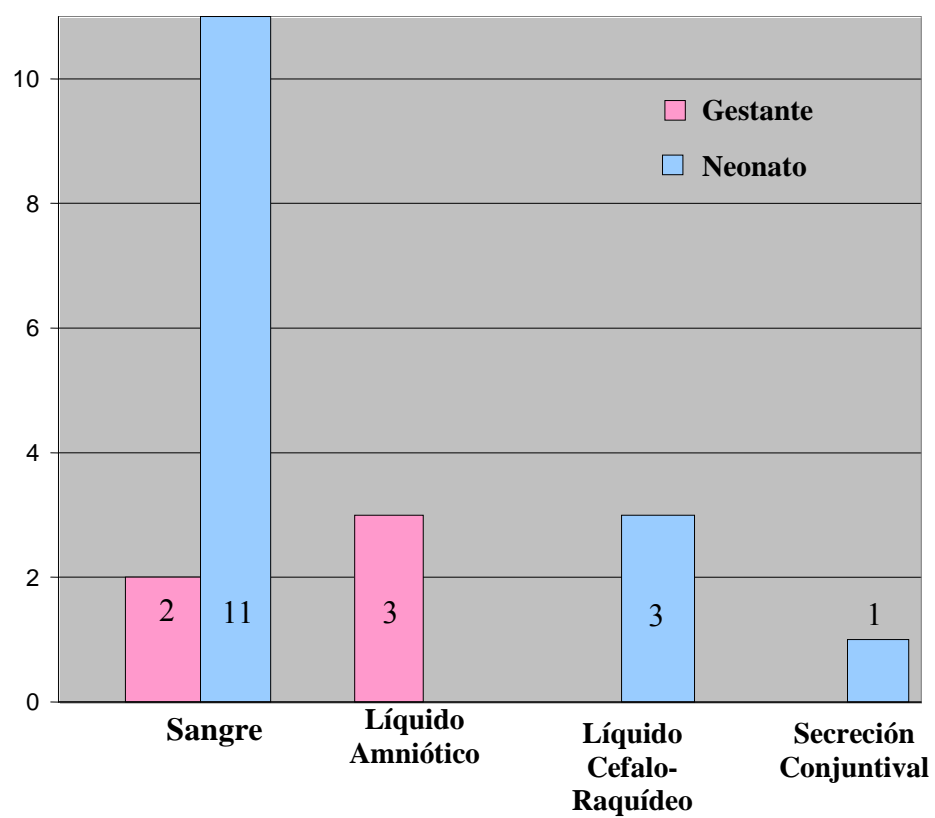


Figura N° 5. Cepas clínicas de *L. monocytogenes* aisladas según el tipo de muestra obtenida en el Hospital San Bartolomé, 2001-2005

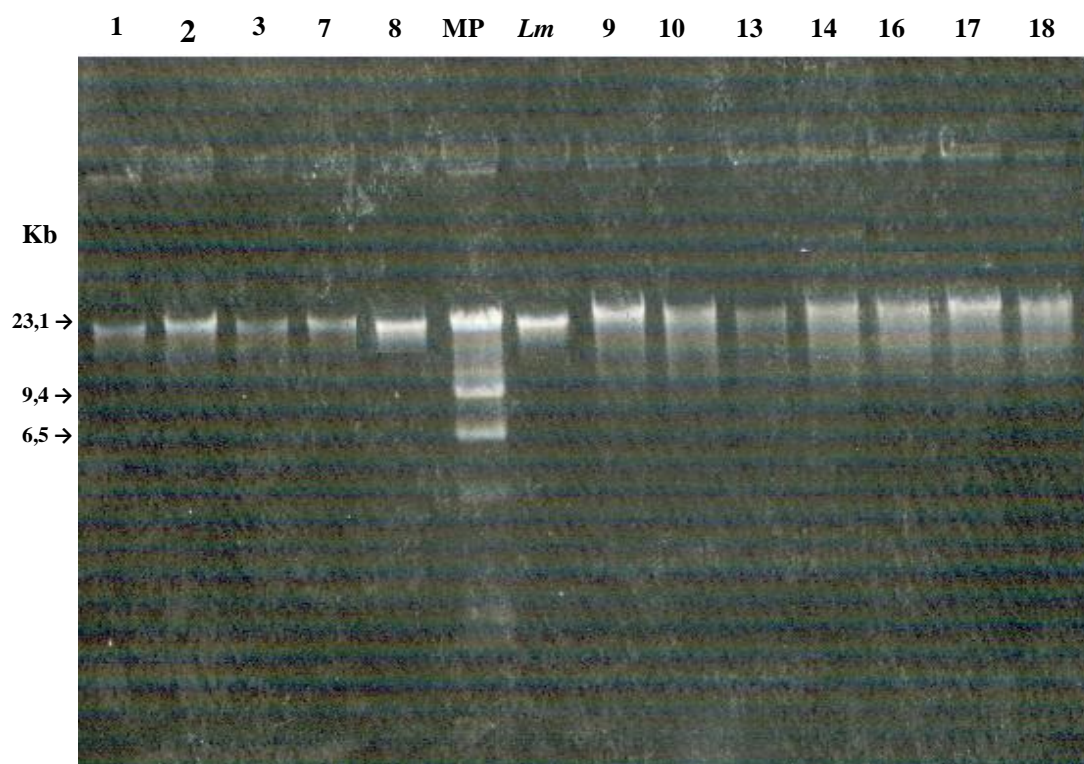


Figura N° 6. ADN genómico de las cepas clínicas de *L. monocytogenes* separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%

El número de las líneas indica el código de cepa; *Lm*, *L. monocytogenes* ATCC 19118; MP, marcador de peso molecular (ADN del fago lambda/ *Hind* III).

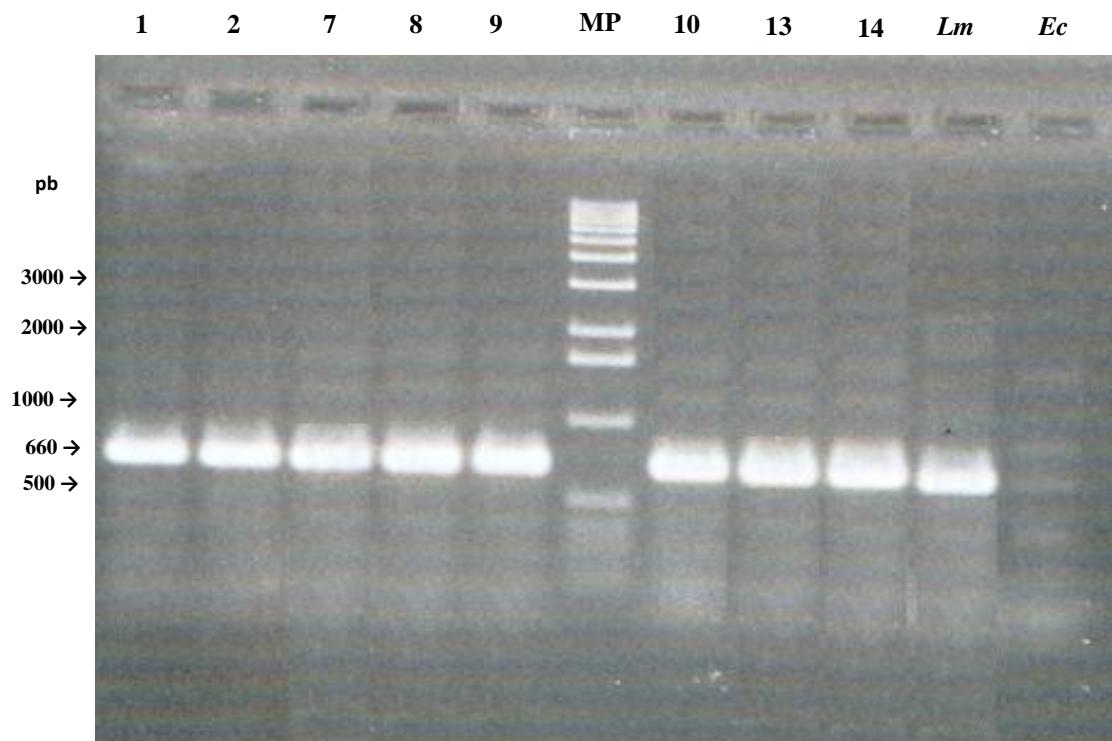


Figura N° 7. Productos amplificados del gen *iap* de *L. monocytogenes* separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%

El número de las líneas indican el código de cepa; *Lm*, *L. monocytogenes* ATCC 19118 (control positivo); *Ec*, *E. coli* ATCC 43887 (control negativo); MP, marcador de peso molecular ladder 1 Kb.

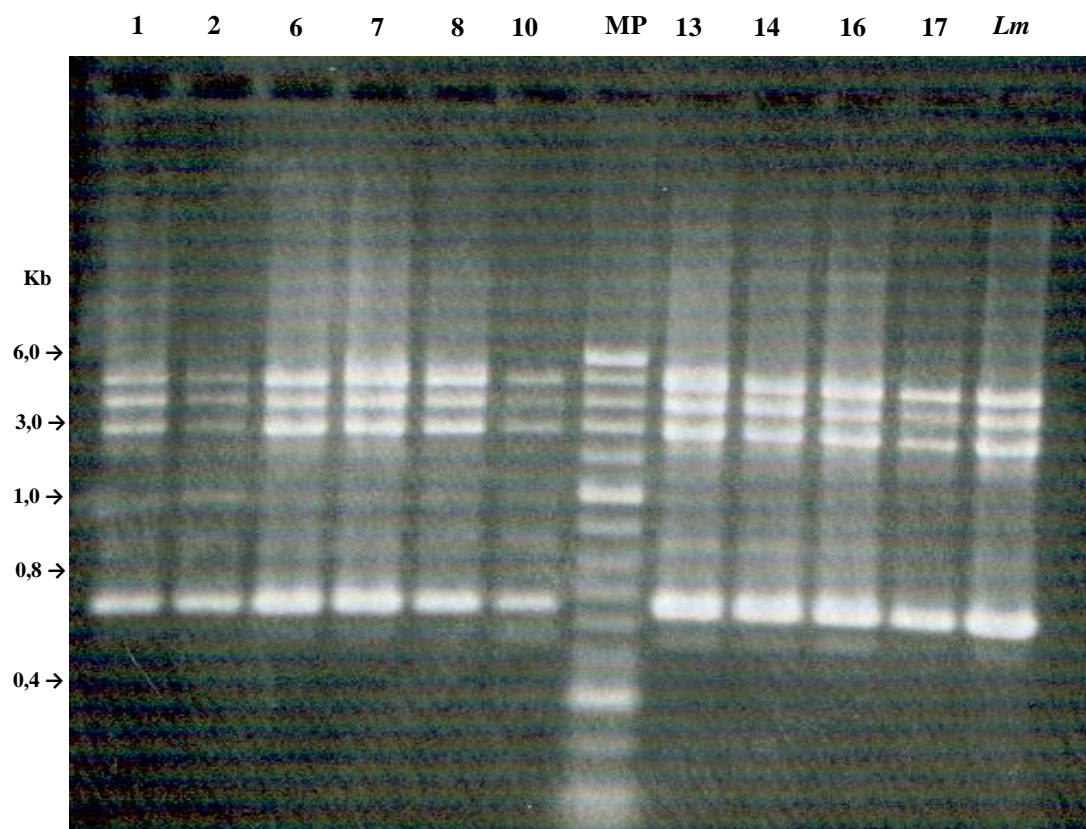


Figura N° 8. RAPD de cepas de *L. monocytogenes* obtenidos con el cebador M13 separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%

El número de las líneas indica el código de cepa; *Lm*, *L. monocytogenes* ATCC 19118; MP, marcador de peso molecular ladder 1 Kb.

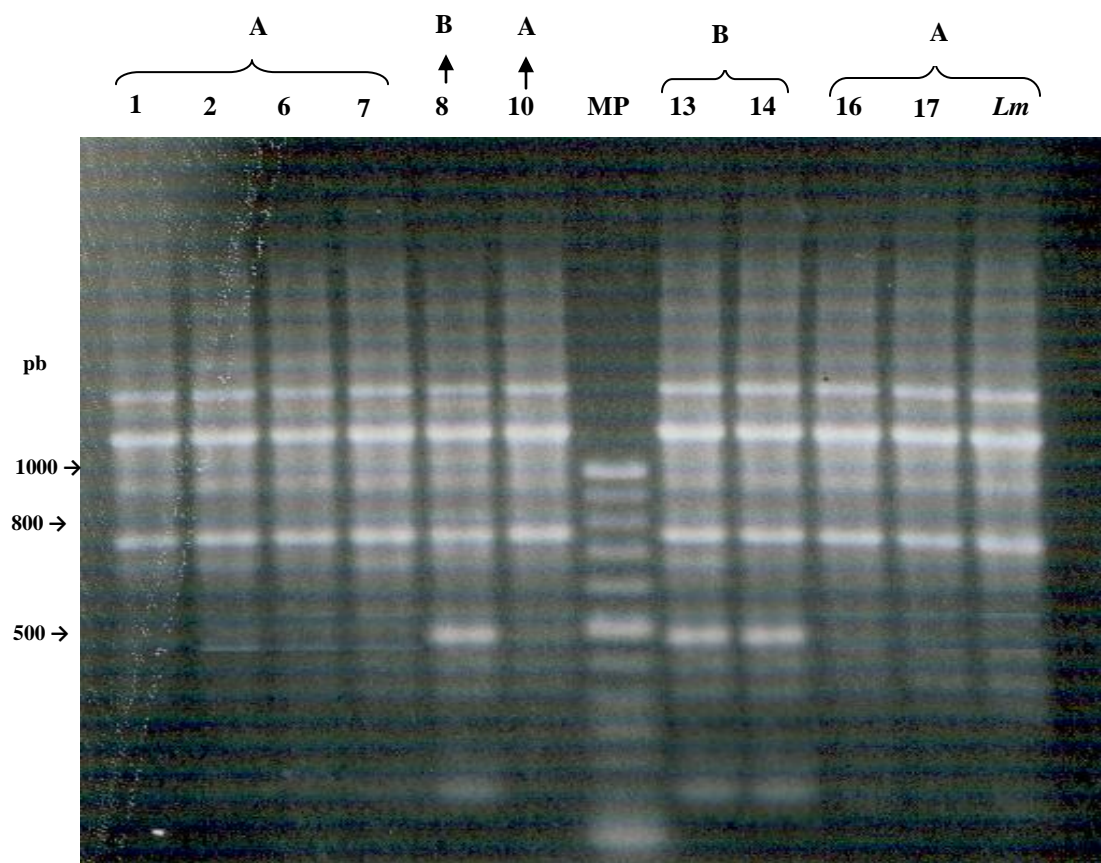


Figura N° 9. RAPD de cepas de *L. monocytogenes* obtenidos con el cebador OMP-01 separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%

El números de las líneas indican el código de cepa y las letras señalan el tipo de perfil de ADN que corresponde con el cebador OMP-01; *Lm*, *L. monocytogenes* ATCC 19118; MP, marcador de peso molecular ladder 100 pb.

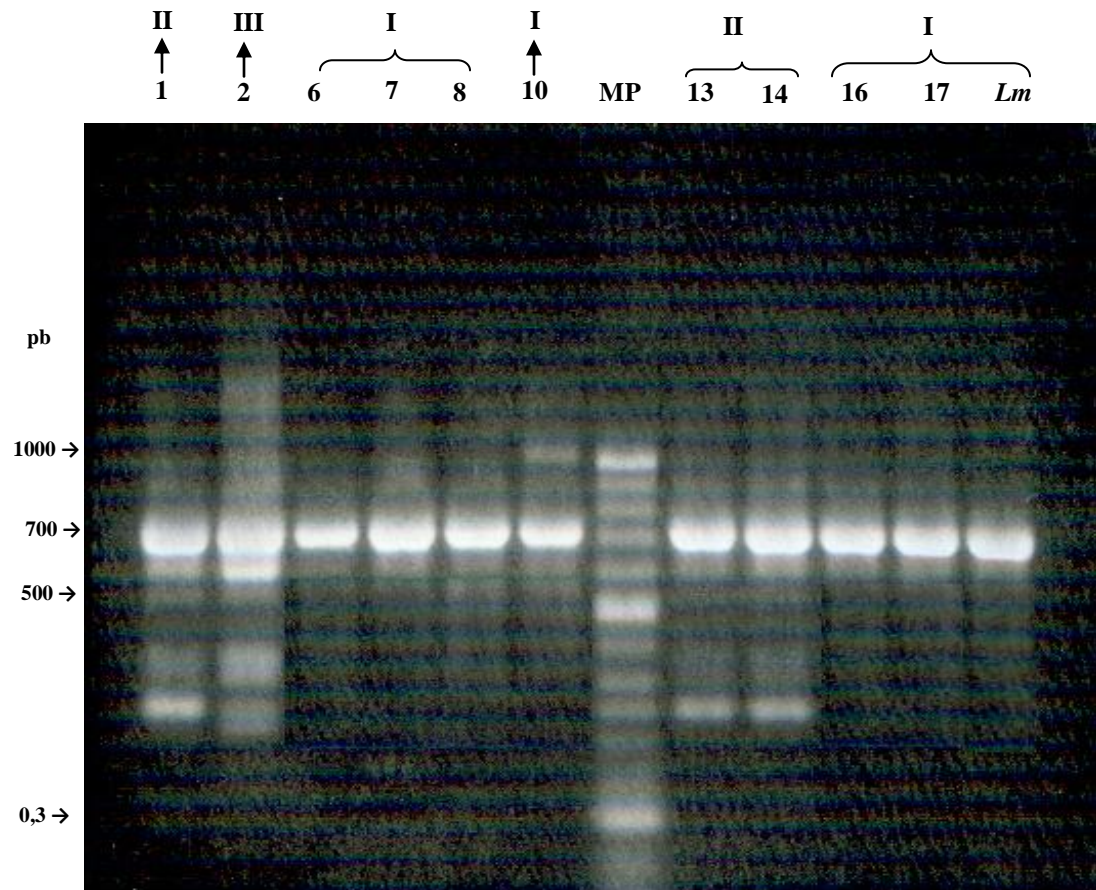


Figura N° 10. RAPD de cepas de *L. monocytogenes* obtenidos con el cebador PJ108 separados por electroforesis en gel de agarosa al 1%

Los números arábigos indican el código de cepa y los números romanos señalan el tipo de perfil de ADN que corresponde con el cebador PJ108; *Lm*, *L. monocytogenes* ATCC 19118; MP, marcador de peso molecular ladder 100 pb.

VI. DISCUSIÓN

Desde que Pereda y colaboradores⁷ publicaron el primer caso de listeriosis neonatal en Lima, otros investigadores continuaron describiendo casos de listeriosis perinatal ocurridos en Perú¹⁰⁻¹⁴. Pereda⁸ reportó la primera serie de 20 casos de listeriosis perinatal ocurridos en un hospital de Lima en los años sesenta. Guevara y colaboradores⁹ presentaron la segunda serie de 17 casos de listeriosis humana ocurridos en dos hospitales de Lima en los años setenta.

En esta investigación se describen 18 casos confirmados de listeriosis perinatal, entre gestantes, recién nacidos, óbitos fetales y abortos, atendidos en el Hospital San Bartolomé de Lima durante los años 2001 al 2005. Este estudio representa la tercera serie de casos de listeriosis perinatal reportado en el Perú.

En Perú, la listeriosis perinatal no se notifica de manera sistemática. Sin embargo, en otros países como Estados Unidos, se conoce que la incidencia de listeriosis perinatal disminuyó de 17,4 casos por cien mil nacidos vivos en 1989 a 8,6 casos por 100 mil nacidos vivos en 1993, debido a las estrictas políticas de salubridad impuestas en la industria de los alimentos y sensibilización de la población acerca del tema¹¹⁶. En Chile, entre 1982 y 1987 se documentó la incidencia de listeriosis perinatal en 42 casos por 100 mil nacidos vivos¹¹⁹.

Los casos de listeriosis de este estudio se presentaron en mujeres gestantes y/o sus recién nacidos vivos, la mayoría con sepsis neonatal, fallecidos (natimuertos, óbitos fetales) o abortos. La infección por *L. monocytogenes* durante la gestación ha sido descrita en más de 40 especies de animales, incluida el hombre¹³⁷⁻¹³⁹. Además, si la gestante está infectada, entonces el feto estará también afectado en más del 90% de los casos¹²³⁻¹²⁶. Los factores de riesgo para desarrollar listeriosis durante el embarazo son la disminución de la inmunidad y la permeabilidad de la barrera placentaria¹⁷¹⁻¹⁷⁶.

Los casos presentados corresponden a son madres jóvenes procedentes del cercado de Lima y distritos del cono norte, tales como: Comas, Los Olivos, Puente Piedra, Independencia y San Juan de Lurigancho. Los lugares de procedencia de las pacientes, se debe principalmente a la facilidad de acceso al hospital San Bartolomé de Lima, por ser un establecimiento público de bajo costo, cuyo ámbito de influencia se circunscribe a Lima metropolitana y principalmente a los distritos del cono norte¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

El aislamiento de bacterias a partir de muestras no estériles como heces, meconio y secreción cervicovaginal, no tienen significado sin un contexto clínico compatible^{5,124}. Así por ejemplo, se reporta el aislamiento de *L. monocytogenes* en las heces del 1 al 10% de personas sanas^{121,122}. En este trabajo, las muestras clínicas en su totalidad se obtuvieron de fluidos corporales estériles, como sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico y secreción conjuntival. En este sentido, las cepas de *L. monocytogenes* caracterizadas corresponden con las manifestaciones clínicas de listeriosis durante la gestación o en el periodo neonatal.

Sin embargo, durante el embarazo, el estado de portador en secreción cervicovaginal sí representa un factor de riesgo para la transmisión de la infección al producto vía canal del parto, pero no para el desarrollo de enfermedad en la madre¹²³⁻¹²⁵. En un estudio realizado entre gestantes del tercer trimestre procedentes de los distritos de San Juan de Miraflores y Villa María del Triunfo se encontraron tres casos positivos para *L. monocytogenes* aislados de 117 muestras de secreción vaginal, lo cual representó una frecuencia del 2,5%¹⁵.

En este estudio, las cepas de *L. monocytogenes* presentaron sus características fenotípicas señaladas en la literatura, tales como reacción positiva a la catalasa y rojo de metilo, motilidad diferencial, tolerancia a la bilis y sal, reacción de CAMP positiva con *S. aureus* y negativa con *R. equi*, y utilización diferencial de los carbohidratos: fermentación de glucosa y ramnosa, pero no

xilosa ni manitol^{5, 37,44}. Esta particularidad de *L. monocytogenes* de mantener aparentemente constantes sus características fenotípicas conlleva al uso de técnicas moleculares para su tipificación; así como, para determinar la asociación entre cepas aisladas e infección¹⁸⁰⁻¹⁸³. Las pruebas serológicas para *L. monocytogenes* no ayudan en el ámbito clínico porque solo tres serotipos se asocian al 90% de todas las infecciones³⁷⁻³⁹.

La PCR permitió confirmar que las cepas en estudio corresponden a *L. monocytogenes* y no a otras especies de *Listeria*. Se utilizó la metodología propuesta por Estrada y Zavaleta^{21,22}, basada en las investigaciones de Bubert y colaboradores¹⁶⁵, quienes utilizan una combinación de cebadores específicos para cada especie de *Listeria*, diseñados para amplificar el gen *iap* que codifica la proteína asociada a invasión p60.

Se utilizó la técnica RAPD por su alto grado de sensibilidad reportado en el genotipado de cepas de *L. monocytogenes*. La versatilidad de la técnica se debe a su simplicidad, rapidez, bajo costo y poder discriminatorio. Su alta capacidad discriminatoria en la genotipificación muchas veces no guarda concordancia con la serotipificación¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. El poder discriminatorio del RAPD puede variar, según sea el número y secuencia de los cebadores arbitrarios y las condiciones de amplificación¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Por otro lado, se ha descrito la baja reproducibilidad de los patrones de ADN cuando se obtiene gran cantidad de fragmentos de ADN por cepa, se utilizan cebadores cortos o éstos presentan un alto porcentaje de A-T; por lo que, se requiere estandarizar las condiciones de la PCR⁵⁴⁻⁵⁶.

En este trabajo, se seleccionó cinco cebadores empleados con buen rendimiento en investigaciones para tipificación molecular de listerias mediante la técnica RAPD^{27,162-170}; sin embargo, solo con los cebadores OMP-01 y PJ108 se encontró capacidad discriminatoria. Con el cebador PJ108 se obtuvo cuatro perfiles de ADN, mientras que con OMP-01 solo dos, lo que evidencia la mejor capacidad discriminatoria del primero. Del mismo modo, las 20 cepas estudiadas se distribuyeron en seis RAPD tipos cuando se relacionaron ambos cebadores

En investigaciones previas, se reporta mayor cantidad de perfiles de ADN obtenidos con el RAPD en la tipificación de listerias, sobretodo en cepas no relacionadas de origen ambiental y alimentario^{27,28,167}. No obstante, otros investigadores^{166,189} señalan también un número reducido de perfiles de ADN, principalmente en cepas clínicas, tal como se observa en este trabajo. Esto indicaría que las cepas patógenas de *L. monocytogenes* circulantes están relacionadas genéticamente⁵.

Lawrence y colaboradores²⁷ utilizando el cebador OMP-01 identificaron 33 RAPD tipos en 91 cepas no relacionadas de *L. monocytogenes* de origen ambiental, alimentario y clínico. Los investigadores consideraron el RAPD como una técnica sencilla, rápida y valuable. En otro estudio, los autores¹⁹⁰ empleando también el cebador OMP-01, observaron 18 perfiles de ADN amplificados de 289 cepas de *L. monocytogenes* procedentes de aves de corral, en este caso los autores resaltaron la buena reproducibilidad del RAPD.

Gravesen y colaboradores¹⁶⁶ en una investigación que comparó diferentes técnicas de genotipificación, entre ellas el RAPD, utilizaron dos cebadores de secuencia arbitraria de 10 bases, siendo OMP-01 uno de ellos. Los investigadores observaron 10 RAPD tipos en 48 cepas de *L. monocytogenes* aisladas del ambiente y animales. Del mismo modo, Wagner y colaboradores¹⁹¹ emplearon la técnica RAPD con 20 cebadores cortos de secuencia arbitraria para tipificar 52 cepas de *L. monocytogenes* procedentes de una planta de alimentos e identificaron 10 RAPD tipos; sin embargo, cuando realizaron el RAPD con el cebador OMP-01 observaron solo 6 RAPD tipos.

Lado y Yousef¹⁸⁶ compararon la genotipificación de nueve cepas de *L. monocytogenes* mediante las técnicas RAPD y PFGE. Con la técnica RAPD, empleando los cebadores PJ108 y PJ118, identificaron solo tres RAPD tipos, mientras que con la PFGE observaron 9 tipos. No obstante, Louie y colaboradores¹⁶⁹ utilizando la técnica RAPD con el cebador PJ108 observaron 21

patrones de banda de ADN en 51 cepas clínicas de *L. monocytogenes* (15 cepas relacionadas entre sí y 36 cepas no relacionadas).

En esta investigación, se encontró mejor capacidad discriminadora del RAPD con el cebador PJ108, cuyo tamaño es de 18 bases, que con el cebador OMP-01 de 10 bases. Hallazgos semejantes, han sido referidos por otros investigadores, quienes señalan que los cebadores cortos produce pocos productos de amplificación debido al mayor número de apareamientos nucleóticos^{169,182}. Por ello, los cebadores largos minimizan la variación de la intensidad de los productos y generan perfiles de ADN más fáciles de interpretar^{169,182}.

Por otro lado, la listeriosis es una enfermedad de transmisión alimentaria, siendo implicados principalmente los productos lácteos que por su alto contenido proteico y graso favorecen el crecimiento bacteriano¹²²⁻¹²⁶. La transmisión se comporta como brotes epidémicos de fuente común, lo que podría justificar la similitud entre las cepas clínicas de *L. monocytogenes* identificadas; es decir, la poca variabilidad de genotipos observados¹⁹²⁻¹⁹⁴. Además, la transmisión vertical y nosocomial de listerias son también posibles, lo que fortalece el hallazgo de pocas cepas circulantes en los casos identificados.

En el presente estudio, se encontró mayor ocurrencia de casos de listeriosis perinatal en momentos puntuales como enero del 2003 y noviembre del 2004. En ambas épocas, el aislamiento de las cepas de *L. monocytogenes* corresponde a iguales perfiles de RAPD tipo para cada una de ellas. Estos hallazgos, plantean la posibilidad de presencia de brotes epidémicos por transmisión cruzada intrahospitalaria o por ingesta común de alimentos contaminados. Sin embargo, se requiere desarrollar investigaciones específicas para dilucidar estas hipótesis, debido a que los datos obtenidos son insuficientes para ello y no fue el propósito de estudio.

Respecto a lo anterior, King y colaboradores¹⁹³ publicaron el caso de dos neonatos que desarrollaron listeriosis, cuyas madres fueron atendidas en una

misma sala de hospitalización. Mientras que, Hof y colaboradores¹⁹⁴ reportaron el caso de un recién nacido que presentó listeriosis nosocomial por transmisión cruzada, a partir de otro neonato contaminado por su madre mediante transmisión vertical. Estos hallazgos fueron confirmados mediante la técnica RAPD, al demostrar que las cepas aisladas en la madre y los dos neonatos tuvieron el mismo perfil de ADN.

VII. CONCLUSIONES

1. Se aislaron 20 cepas clínicas de *Listeria monocytogenes* a partir de 18 casos de listeriosis perinatal atendidos en el Hospital Madre Niño San Bartolomé de Lima durante los años 2001 y 2005.
2. Las cepas clínicas se identificaron mediante las pruebas bacteriológicas convencionales de *L. monocytogenes*, tales como presencia de β -hemólisis incompleta, reacción de CAMP positiva con *S. aureus* y negativa con *R. equi* y la utilización de D-glucosa y L-ramnosa pero no de D-xilosa, ni D-manitol.
3. Las cepas clínicas de *L. monocytogenes* se confirmaron mediante la PCR y tipificaron con la técnica RAPD, usando los cebadores OMP-01 y PJ108. Se observaron 6 RAPD con la distribución siguiente: 8 cepas del tipo A-I; tres en cada uno de los tipos A-II, A-III y B-II; dos del tipo B-I; y una cepa del tipo A-IV. El genotipo A-I fue el más frecuente (40%) entre las cepas en estudio.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. MVZ-Córdoba 2005; 10: 513-43.
2. Schlech W. Foodborne listeriosis. Clin Infect Dis 2000; 31: 770-5.
3. Gray M, Killinger A. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. Bacteriol Rev 1966; 30: 309-82.
4. Farber J, Peterkin P. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev 1991; 55: 476-511.
5. Vásquez-Boland J, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 584-640.
6. Geldres C. *Listeria monocytogenes* en ovinos (primer aislamiento en el Perú). Rev Fac Med Vet 1957; 12: 111-23.
7. Pereda J, Orbegoso C, Larich M. Listeriosis en el recién nacido. Reporte de un caso. Rev Med Per 1963; 32: 135-40.
8. Pereda J. Estudio de las lesiones histológicas de la listeriosis del feto y el recién nacido. [Tesis Doctoral]. Lima, Perú. Universidad Peruana Cayetano Heredia, 1977.
9. Guevara J, Pereda J, Roel S. Human listeriosis in Peru. Tropenmed Parasitol 1979; 30: 59-61.
10. Guevara J. A case of hematometra infected by *Listeria monocytogenes*. Zbl Bakt Hyg I Abt Orig A 1979; 243: 547-8.
11. Ferrufino J, Del Castillo M, Taxa L. Listeriosis perinatal. Rev Med Hered 1997; 8: 116-21.
12. Alvaro M, Maguiña C, Figueroa E, Calderón V, Cabala P, Cabrera K. Meningitis neonatal por *Listeria monocytogenes*: Reporte de un caso en el

- Hospital III Puno EsSalud. VIII Congreso SPEIT, 2003. Lima, Perú. Rev Per Enferm Infecc Trop 2003; 2: 26.
13. Álamo C, Rondón A. Meningoencefalitis por *Listeria monocytogenes*. Paediatrica 2006; 8: 39-42.
 14. Palomino V. Muerte fetal por listeria: Reporte de un caso. VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica 2006.
 15. Baca H, Lam J, Piña F, Gómez D. Listeriosis en gestantes. Lima-Perú. Rev Per Obst Enf USMP 2008; 4: 2-6.
 16. Fuchs R, Sirvas S, Carvajal G. Aislamiento de listerias en ceviches. VIII Congreso Peruano de Microbiología y Parasitología, 1990. Lima, Perú. p 69.
 17. Fuchs R, Sirvas S. Incidence of *Listeria monocytogenes* in acidified fish product, ceviche. Letter in Applied Microbiology 1991; 12: 88-90.
 18. Centurión M, Takajara M. Determinación de la incidencia de *Listeria monocytogenes* en pollos frescos y verduras frescas obtenidos en mercados y centros de abastecimiento de Lima Metropolitana. [tesis]. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM, Lima; 2004.
 19. Villanueva E. *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de 5 mercados de expendio de Lima, 2002. [tesis]. Facultad de Biología UNMSM, Lima; 2002.
 20. Espinoza A, De la Torre M, Salinas M, Sánchez V. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados de los distritos de Ica, Enero-Marzo 2003. Rev Per Med Exp Salud Pública 2004; 21: 71-75.
 21. Estrada O. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda obtenida en establos del departamento de Lima. [tesis]. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM, Lima; 2004.
 22. Estrada O, Zavaleta A. Genotipificación de cepas *Listeria monocytogenes* aisladas de leche cruda de diferentes ganaderías de Lima mediante el ADN polimórfico amplificado al azar. Ciencia e Investigación 2004, 7: 9-15.

23. Rodríguez I, Barrera H. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL* 2004; 7: 323-35.
24. Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 355-60.
25. Xena N. Una década de aplicación del método RAPD: alcances y límites en el estudio de relaciones genéticas en plantas. *Acta Científica Venezolana* 2000; 51: 197-206.
26. Olivier M, Meehl M, Lust G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) sequences as markers for canine genetic studies. *J Hered* 1999; 90: 78-82.
27. Lawrence L, Harvey J, Gilmour A. Development of random amplification of Polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 3117-9.
28. Czajka J, Batt C. Verification of causal relationships between *Listeria monocytogenes* isolates implicated in food-borne outbreaks of listeriosis by randomly amplified polymorphic DNA patterns. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1280-87.
29. Kerouanton A, Brisabois A, Denoyer E, Dilasser F, Grout J, Salvat G, Picard B. Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 1998; 43: 61-71.
30. Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, et al. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 2001; 294: 849-52.
31. Doumith M, Cazalet C, Simoes N, Frangeul L, Jacquet C, Kunst F, et al. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect Immun* 2004; 72: 1072-83.
32. Orndorff P, Hamrick TS, Smoak I, Havell E. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. *Vet Microbiol* 2006; 114: 1-15.
33. Wing E, Gregory S. *Listeria monocytogenes*: Clinical and experimental update. *J Infect Dis* 2002; 185 (Suppl 1): S18-24.

34. Ooi S, Lorber B. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. Clin Infect Dis 2005; 40: 1327-32.
35. Pigrau C. Infecciones por *Listeria*. Medicine 2002; 8: 3352-5.
36. Pearson L, Marth E. *Listeria monocytogenes* –threat to safe food supply: a review. J Dairy Sci 1990; 73: 912-28.
37. Schuchat A, Swaminathan B, Broome C. Epidemiology of human listeriosis. Clin Microbiol Rev 1991; 4: 169-83.
38. Janda JM, Abbott SL. Unusual food-borne pathogens. *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* and *Edwardsiella* species. Clin Labor Med 1999; 19: 553-82.
39. Oteo J, Alós J. *Listeria* y Listeriosis [en internet] [citado 2004 Dic 2]. Disponible en URL: <http://www.seimc.es>.
40. Tasayco R. Factores de desarrollo y medios de cultivo para el aislamiento de *Listeria monocytogenes*. [tesis]. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM, 1991.
41. Moscoso J. Efecto agregado de ácidos y temperatura sobre el desarrollo de *Listeria monocytogenes*. [tesis]. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM, 1993.
42. Besse N, Brissonnet F, Lafarge V, Leclerc B. Effect of various environmental parameters on the recovery of sublethally salt-damaged and acid-damaged *Listeria monocytogenes*. J Appl Microbiol 2000; 89: 944-50.
43. McKellar R. Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 1994; 60: 4219-25.
44. Fernández-Garayzábal J, Suárez G, Blanco M, Gibello A, Domínguez L. Taxonomic note: a proposal for reviewing the interpretation of the CAMP reaction between *Listeria monocytogenes* and *Rhodococcus equi*. Int J Syst Bacteriol 1996; 46: 832-4.
45. Tang Y, Procop G, Persing D. Molecular diagnostic of infectious diseases. Clin Chem 1997; 43: 2021-38

46. Batt C. Molecular diagnostics for dairy-borne pathogens. J Dairy Sci 1997; 80: 220-9.
47. Struelens M. Molecular epidemiology typing systems of bacterial pathogens: current issues and perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998, 93: 581-5.
48. Olive M, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol 1999; 37: 1661-9.
49. McDade J, Anderson B. Molecular epidemiology: applications of nucleic acid amplification and sequence analysis. Epidemiol Rev 1996; 18: 90-7.
50. Saladrigas M, Claros G, Gonzáles-Halphen D. Vocabulario inglés español de bioquímica y biología molecular (4ta entrega). Panacea 2003, 4: 239-50.
51. Bardakci F. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. Turk J Biol. 2001, 25: 185-96.
52. Micheli M, Bova R, D'Ambrosio E. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. Nucleic Acids Res 1994; 22: 1921-22.
53. Yoshida T, Takbuchi M, Sato M, Hirai K. Typing *Listeria monocytogenes* by random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. J Vet Med Sci 1999, 61: 857-60.
54. Brosch R, Chen J, Luchansky J. Pulsed field fingerprinting of *Listeriae*: identification of genomic division for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. Appl Environ Microbiol 1994; 60: 2584-92.
55. Wiedmann M, Bruce J, Keating C, Johnson A, Donough P, Batt C. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with difference a pathogenic potential. Infect Immun 1997; 65: 2707-16.
56. Nadon C, Woodward DJ, Young C, Rodgers FG, Wiedmann M. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. Clin Microbiol 2001; 39: 2704-7.

57. Borucki M, Call D. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. J Clin Microbiol 2003; 41: 5537-40.
58. Cossart P, Lecuit M. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. The EBBO Journal 1998; 17: 3797-806.
59. Portnoy D, Auerbuch V, Glomsky I. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. J Cell Biol 2002, 158: 409-14.
60. Lecuit M. Understanding how *Listeria monocytogenes* crosses host barriers. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 430-6.
61. Southwick F, Purich D. Intracellular pathogenesis of listeriosis. N Eng J Med 1996; 334: 770-6.
62. Portnoy D, Chakraborty J, Goebel W, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. Infect Immun 1992; 60: 1263-7.
63. Doyle M. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. Food Research Institute, University of Wisconsin-Madison, 2001. 1: 1-13.
64. Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 14-56.
65. Gray M, Freitag N, Boor K. How the listerial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. Infect Immun 2006; 74: 2505-12.
66. Navarre W, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol Mol Biol Rev 1999; 73: 174-229.
67. Galán J. Alternative strategies for becoming an insider: lessons from the bacterial world. Cell 2000; 103: 363-6.
68. Lecuit M, Vandormael-Pournin S, Lefort J, Huerre M, Gounon P, Dupuy C, Babinet C, Cossart P. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. Science 2001; 292: 1722-5.

69. Ireton K. Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* in to mammalian cells. *Cell Microbiol* 2007; 9: 1-11.
70. Bierne H, Cossart P. Inl B, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasive and growth factor. *J Cell Science* 2002; 115: 3357-67.
71. Njoku-ohi A, Jenkins E, Njoku-ohi J, Adams J, Covintong V. Production and nature of *Listeria monocytogenes* hemolysin. *J Bacteriol* 1963; 86: 1-8.
72. Parrisius J, Bakdi S, Roth M, Tranun-Jensen J, Goebel W, Seeliger H. Production of listeriolysin by beta-hemolytic strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 1986; 51: 314-9.
73. Gedde M, Higgins D, Tilney L, Portnoy D. Role of the listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 2000; 68: 1999-1003
74. Geoffroy C, Raveneau J, Berelli J, Lecroisis A, Vásquez-Boland J, Alouf J, Berche P. Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 1991; 59: 2382-8.
75. Titball R. Bacterial phospholipases C. *Microbiol Rev* 1993; 57: 347-66.
76. Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston N, Portnoy D, Goldfine H. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* 1995; 63: 4231-7.
77. Goldfine H, Bannam T, Johnston NC, Zuckert R. Bacterial phospholipases and intracellular growth: the two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* 1998; 84 (Suppl): 7S-14S.
78. Ghannoum M. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 122-43.
79. Coffey A, Van den Burg B, Velmant R, Abee T. Characteristics of the biologically active 35-kDa metalloprotease virulence factor from *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* 2000; 88:132-41.

80. Preuss I, Kaiser I, Gehring U. Molecular characterization of a phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C. *Eur J Biochem* 2001; 268: 5081-91.
81. Grundling A, Gonzáles M, Higgins D. Requirement of the *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipases PC-PLC during infection of human epithelial cells. *J Bacteriol* 2003; 185: 6295-307.
82. Tilney L, Connelly P, Portnoy D. Actin filament nucleation by the bacterial pathogen, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 1990; 111: 2979-88.
83. Maddock J, Alley M, Shapiro L. Polarized cells, polar actions. *J Bacteriol* 1993; 175: 7125-29.
84. Mourrain P, Lasa I, Gautreau A, Gouin E, Pousley A, Cossart P. Act is dimmer (actin polymerization /*Listeria monocytogenes*). *Prot Natl Acad Sci* 1997; 94: 10034-9.
85. Cossart P. Subversion of the mammalian cells cytoskeleton by invasive bacteria. *J Clin Invest* 1997, 99: 2307-11.
86. Cossart P, Sansonetti P. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 2004; 304: 242-8.
87. Cossart P. Actin-based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player. *Cell Microbiol* 2000, 2: 195-205.
88. Roberts T, Stewart M. Acting like actin: the dynamics of the nematode major sperm protein (MSP) cytoskeleton indicate a push-pull mechanism for amoeboid cell motility. *J Cell Biol* 2000; 149: 7-12.
89. Kuo S, McGrath J. Steps and fluctuations of *Listeria monocytogenes* during actin-based motility. *Nature* 2000; 407: 1026-9.
90. Goldberg M. Actin-based motility of intracellular microbial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001, 65: 595-626.
91. Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechai F, Mamzer MF, et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 136-8.

92. Perrin M, Berner M, Delamare C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. J Clin Microbiol 2003; 41: 5308-9.
93. Seeliger H, Emmerling P. Epidemiologie, klinic and therapie der Listeriose. Med Klin 1970; 65: 279-82.
94. Seeliger H. New outlook on the epidemiology and epizootology of listeriosis. Acta Microbiol Acad Sci Hung 1972; 19: 273-86.
95. Kalis P, Le Frock J, Smith W, Keefe M. Listeriosis. Amer J Med Sci 1976; 271:159-69.
96. Farber J, Losos J. *Listeria monocytogenes*: a foodborne pathogen. Can Med Assoc J 1988; 138: 413-8.
97. Schuchat A, Deaver K, Wenger J, Plikaytis B, Mascola L, Pinner R, et al. Role of foods in sporadic listeriosis. I. Case-control study of dietary risk factors. JAMA 1992; 267:2041-5.
98. Pinner R, Schuchat A, Swaminathan B, Hayes P, Deaver K, Weaver R, et al. Role of foods in sporadic listeriosis. II. Microbiologic and epidemiologic investigation. JAMA 1992; 267:2046-50.
99. Lorber B. Listeriosis. Clin Infect Dis 1997; 24: 1-11.
100. Julián A, Jiménez A, De Górgolas M, Fernández R, Fernández ML. Infecciones por *Listeria monocytogenes* en el adulto. Aspectos clínicos y microbiológicos de una enfermedad cambiante. Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19: 297-303.
101. Alcoba M, Carro JA, Pérez M, Guerra J, Fernández L, Arto L. Meningitis por *Listeria monocytogenes*. Presentación de 10 casos y revisión de la literatura. Rev Clin Esp 2002; 202: 638-43.
102. Doganay M. Listeriosis: clinical presentation. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 35: 173-5.
103. Hof H. History and epidemiology of listeriosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 35: 199-2002.
104. Braden C. Listeriosis. Pediatr Infect Dis J 2003; 22: 745-6.

105. Arias I, Nuño FJ, Noval J, Fonseca E, Menéndez M. Listeriosis en el adulto. Revisión de 10 casos. *An Med Interna (Madrid)* 2004; 21: 75-8.
106. Gelfand M. Clinical manifestations and treatment of *Listeria monocytogenes* infection in adults [en internet] [citado 2005 May 5]. Disponible en URL: <http://www.uptodate.com>.
107. Bowmer E, Mckiel J, Cockcroft W, Schmitt N, Rappay D. *Listeria monocytogenes* infections in Canada. *Can Med Assoc J* 1973; 109: 125-35.
108. Dalton C, Austin C, Sobel J, Hayes P, Bibb W, Graves L, et al. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New Eng J Med* 1997; 336: 100-5.
109. Ericsson H, Erlow A, Danielsson-Tham ML, Loncarevic S, Mentzing LO, Persson I, et al. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2904-7.
110. Miettinen M, Siitonen A, Heiskanen P, Haajanen H, Bjorkroth K, Kokkeala H. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2358-60.
111. Voelker R. Listeriosis outbreak prompts action-finally. *JAMA* 2002; 288: 2675-6.
112. Siegman-Igra Y, Levin R, Weinberger M, Golan Y, Schwartz D, Samra Z, et al. *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. *Emerging Infectious Diseases* 2002; 8: 305-10.
113. McDonald P, Whitman RE, Boggs J, McCornack N, Anderson KL, Reardon J, et al. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 677-82.
114. Olsen S, Patrick M, Hunter S, Reddy B, Kornstein L, Mac Kenzie R, et al. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 962-7.

115. Dorozynski A. Seven die in French *Listeria* outbreak. BMJ 2005; 320: 601.
116. Tappero JW, Schuchat A, Deaver KA, Mascola L, Wenger JD. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States: effectiveness of prevention efforts? J Am Med Assoc 1995; 273: 1118-22.
117. Silver HM. Listeriosis during pregnancy. Obstet Gynecol Surv 1998; 53: 737-40.
118. Benshushan A, Tsafir A, Arbel R, Rahav G, Ariel I, Rolansky N. *Listeria* infection during pregnancy: a 10 year experience. IMAJ 2002; 4: 776-80.
119. Cisternas A, Lagos N, Galstuch J, Gonzáles C, García C, Díaz J. Infección por *Listeria monocytogenes* y embarazo con buen resultado Perinatal. Rev Chil Obstet Ginecol 2002, 67: 237-41.
120. Chaparro M, Curiel E, Prieto M, Weil B, Ruiz M, Fernández M. Listeriosis en gestante con muerte fetal intraútero. Med Intensiva 2004; 28:332-4.
121. Grif K, Patscheider G, Dierich M, Allerberger F. Incidence of fecal carriage of *Listeria monocytogenes* in three healthy volunteers: a one year prospective stool survey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 16-20.
122. Ramaswamy V, Cresence V, Rejitha J, Lekshmi M, Dharsana K, Prasad S, Vijila H. *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. J Microbiol Immunol Infect 2007; 40: 4-13.
123. Di Maio H. *Listeria* infection in women. Prim Care Update Ob/Gyns 2000; 7: 40-5.
124. Mylonakis E, Paliou M, Hormann E, Calderwood S, Wing E. Listeriosis during pregnancy. A case series and review of 222 cases. Medicine 2002, 81:260-9.
125. Topalovsky M, Yang SS, Boonpasat Y. Listeriosis of the placenta: clinic pathologic study of seven cases. Am J Obstet Gynecol 1993; 169: 616-20.
126. Cruz M, Carretero P, Cámara M, Fernández J, Caño A, Jiménez F. Listeriosis durante la gestación. Un problema diagnóstico. Prog Obstet Ginecol 2002; 45: 265-8.

127. Schlech W. *Listeria* gastroenteritis-Old syndrome, new pathogen [editorial]. New Eng J Med 1997; 336: 130-2.
128. Schlech W, Schlech W, Haldane H, Mailman T, Warhuus M, Crouse N, Haldane D. Does sporadic *Listeria* gastroenteritis exist? A 2-years-population-based survey in Nova Scotia, Canada. Clin Infect Dis 2005; 41: 778-84.
129. Hof H. *Listeria monocytogenes*: a causative agent of gastroenteritis? Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 369-73.
130. Wilson S, Drevets D. *Listeria monocytogenes* infection and activation of human brain microvascular endothelial cells. J Infect Dis 1998; 178: 1658-66.
131. Tauber M, Moser B. Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications. Clin Infect Dis 1999, 28: 1-11.
132. Librach I, Seth R. Human listerial meningitis. J Clin Path 1961; 14: 193-5.
133. Redline RW, Lu CY. Role of local immunosuppression in murine fetoplacental listeriosis. J Clin Invest 1987; 79: 1234-41.
134. Redline RW, Lu CY. Specific defects in the anti-listerial immune response in discrete regions of the murine uterus and placenta account for susceptibility to infection. J Immunol 1988; 140: 3947-55.
135. Susuki K, Tomasi T. Immune responses during pregnancy. J Exp Med 1979; 150: 898-908.
136. Hamrick TS, Horton JR, Spears PA, Havell EA, Smoak IW, Orndorff. Influence of pregnancy on the pathogenesis of listeriosis in mice inoculated intragastrically. Infect Immun 2003; 71: 5202-9.
137. Abram M, Schluter D, Vuckovic D, Wraber B, Doric M, Deckert M. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection . FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 35: 177-82.

138. Barber E, Pollard J. The uterine NK cell population requires IL-15 but these cells are not required for pregnancy not the resolution of a *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 2003; 171: 37-46.
139. Barber E, Fazzari M, Pollard J. Th1 cytokines are essential for placental immunity to *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 2005; 73: 6322-31.
140. Floridon C, Nielsen O, Holund B, Sunde L, Westergaard JG, Thomsen SG, Teisner B. Localization of E-cadherin in villous, extravillous and vascular trophoblast during intrauterine, ectopic and molar pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 943-50.
141. Lecuit M, Nelson M, Smith SD, Kuhn H, Huerre M, Vacher-Lavenu MC, et al. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: Role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 6152-7.
142. Lecuit M, Cossart P. Bases moléculaires du tropisme fetoplacentaire de *Listeria monocytogenes*. *Medicine Science* 2005; 21: 17-9.
143. Labarrere CA, Ortiz MA, Sosa MJ, Campana GL, Wernicke M, Baldrige LA, et al. Syncytiotrophoblast intercellular adhesion molecule-1 expression in placental villitis of unknown cause. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193 :483-8.
144. Bakardjiev A, Stacy B, Fisher S, Portnoy D. Listeriosis in the pregnant guinea pig: a model of vertical transmission. *Infect Immun* 2004; 72: 489-97.
145. Bakardjiev A, Stacy B, Portnoy D. Growth of *Listeria monocytogenes* in the guinea pig placenta and role of cell-to cell spread in fetal infection. *J Infect Dis* 2005; 191: 1889-97.
146. Bakardjiev A, Theriot J, Portnoy D. *Listeria monocytogenes* traffics from maternal organs to the placenta and back. *PLoS Pathog* 2006; 2: 623-31.
147. Mascola L, Ewert DP, Eller A. Listeriosis: a previously medical complication in women with multiple gestations. *Am J Obstet Gynecol* 1994, 170: 1328-32.

148. Nolla-Salas J, Bosh J, Passer I, Vinas L, De Simon M, Almela M, et al. Perinatal listeriosis: a population-based multicenter study in Barcelona, Spain (1990-1996). *Am J perinatol* 1999; 15: 461-7.
149. Plaza M, Gilbert-Barness E. Fetal death in uterus secondary to *Listeria monocytogenes* placental infection. *Pediatr Pathol Molecular Med* 2001; 20: 433-7.
150. Sanchez E, Castillo A, Ortega C. Infección perinatal por *Listeria*: reporte de un caso. *Rev Colomb Obstet Ginecol* 2001; 52: 1-4.
151. Doblas P, Eguluz I, Barber M, Hijano JV, Gómez M, Monis S, et al. Listeriosis y gestación. *Clin Invest Ginecol Obstet* 2002; 29: 233-7.
152. Ocaña M, Coroleu W, Goma M, Bel J, Natal A. Valor del examen de la placenta. A propósito de un caso de meningitis neonatal. *An Esp Pediatr* 2002; 57:268-78.
153. Gupta V, Gautam V, Mehta N, Kumari I, Joshi R. Listeriosis in second trimester of pregnancy: case report from India. *Jpn J Infect Dis* 2003; 56: 60-1.
154. Ogunmodede F, Jones J, Scheftel J, Kirkland E, Schulkin J, Lynfeld R. Listeriosis prevention among pregnant women in USA. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2005; 13:11-15.
155. Barber M, Okibadejo O. Maternal and neonatal listeriosis. Report of case and brief review of literature of listeriosis in man. *Br Med J* 1965; 2: 735-8.
156. Beck A, O'Brian P, Mackenzie V. Case of stillbirth due to with *Listeria monocytogenes*. *J Clin Path* 1966; 19:567-9.
157. Millar R, Kisker C. Disseminated intravascular coagulation in newborn infant with *Listeria* sepsis. *J Pediatr* 1973; 83: 640-2.
158. Spencer J. Perinatal listeriosis. *Br Med J* 1987; 292: 349.
159. Laciari A, Hasuoka R, Correa S, Miranda A, Centorbi O. Symptomatic hydrocephalus in a newborn infected with *Listeria monocytogenes*. *Brazil J Microbiol* 2000; 31: 9-11.

160. Frat J, Veinstein A, Wager M, Burucoa C, Robert R. Reversible acute hydrocephalus complicated *Listeria monocytogenes* meningitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 512-4.
161. Chen S, Lu F, Lee P, Lu C, Chen C, Chou H, et al. Neonatal listeriosis. J Formos Med Assoc 2007; 106: 161-4.
162. Bille J, Catimel B, Bannerman E, Jacquet C, Yersin M, Caniaux I, Monget D, Rocourt J. API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. Appl Environ Microbiol 1992; 58: 1857-60.
163. BioMérieux. API *Listeria*. Inserto del producto. [en internet] [Citado el 20.06.05]. Disponible en:
URL: <http://www.biomerieux.com/servlet/srt/bio/portail/home>
164. Zavaleta A, Martínez-Murcia A, Rodríguez-Valera F. Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 1261-7.
165. Bubert A, Hein I, Rauch M, Lehner A, Yoon B, Goebel W, Wagner M. Detection and differentiation of *Listeria spp* by single reaction based on multiplex PCR. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 4688-92.
166. Gravesen A, Jacobsen T, Moller P, Hansen F, Larsen A, Kochel S. Genotyping of *Listeria monocytogenes*: comparison of RAPD, ITS and PFGE. Int J Food Microbiol 2000; 57: 43-51.
167. Wulf G, Gram L, Ahrens P, Fonnesbech B. One group of genetically similar *Listeria monocytogenes* strains frequently dominates and persists in several fish slaughter and smokehouses. App Environ Microbiol 2006; 72: 4313-22.
168. Martinez I, Rovik L, Brox V, Lassen J, Seppola M, Gram L, Fonnesbech-Vogel B. Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical sample and processing environments estimated by RAPD typing. Int J Food Microbiol 2003; 84: 285-97.

169. Louie M, Jayaratne P, Luchsinger I, Derenish J, You J, Schelch W, Simor A. Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocytogenes*. J Clin Microbiol 1996; 34: 15-9.
170. Franciosa G, Tartaro S, Wedell-Noorgaard C, Aureli P. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in invasive and no invasive listeriosis outbreaks by PCR-based fingerprinting techniques. App Environ Microbiol 2001; 60: 1793-9.
171. Goldenberg R, Thompson C. The infectious origins of stillbirth. Am J Obstet Gynecol 2003; 189: 64-73
172. Genovese F, Mancuso G, Cuzzola M, Biondo C, Beninati C, Delfino D, Teti G. Role of IL-10 in a neonatal mouse listeriosis. J Immunol 1999; 163: 2777-82.
173. Smith M, Takeuchi K, Brackett R, McClure H, Raybourne R, Williams K, et al. Nonhuman primate model for *Listeria monocytogenes* –induced stillbirths. Infect Immun 2003; 71: 1574-9.
174. Luft B, Remington J. Effect of pregnancy on resistance to *Listeria monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* infections in mice. Infect Immun 1982; 38: 1164-71.
175. LeMonnier A, Join-Lambert O, Jaubert F, Berche P, Kayal S. Invasion of the placenta during murine listeriosis. Infect Immun 2006; 74: 663-72.
176. Robbins J, Skarzynczynska k, Zeldovich B, Kapidzic M, Bakardjiev A. Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of *Listeria monocytogenes*. Plos Pathog 2010, 6: e1000732.
177. HONADOMI. Compendio Estadístico 2006. Hospital Nacional Docente Materno Infantil San Bartolomé, MINSA. Lima, Perú.
178. HONADOMI. Plan Estratégico 2007-2011. Hospital Nacional Docente Materno Infantil San Bartolomé, MINSA. Lima, Perú.

179. HONADOMI. Plan Operativo Anual 2009. Hospital Nacional Docente Materno Infantil San Bartolomé, MINSA. Lima, Perú.
180. Bessesen M, Luo Q, Rotbart H, Blaser M, Elison R. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol 1990; 56: 2930-2.
181. Volokhov D, Rasooly A, Chumakov K, Chizhikov V. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. J Clin Microbiol 2002; 40: 4720-8.
182. Lado B, Yousef A. Selection and identification of a *Listeria monocytogenes* target strain for Pulsed Electric Field process optimization. App Environ Microbiol 2003; 69: 2223-9.
183. Destro M, Leitao M, Farber J. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. App Environ Microbiol 1996; 62: 705-11.
184. Berg D, Akopyantz N, Kersulyte D. Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. Me Mol Cell Biol 1994; 5: 174-85.
185. Artiushin S, Minion C. Arbitrarily primed PCR analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Int J Syst Bacteriol 1996; 46: 324-8.
186. De Cesare A, Manfoda G, Dambaugh T, Guerzoni M, Franchini A. Automated ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular typing of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella tiphymurium* isolates in Italy. J App Microbiol 2001; 91: 780-5.
187. Mac Gowan A, O'Donaghue K, Mac Lauchlin J, Bennet P, Reeves D. Typing of *Listeria spp* by Random amplified of polymorphic DNA (RAPD). J Med Microbiol 1993; 38: 322-7.
188. Dhanashree B, Otta S, Karunasagar I, Karunasagar I. Typing of *Listeria monocytogenes* isolates by Random amplification of polymorphic DNA. Indian J Med Res 2003; 117: 19-24.

189. Inoue S, Katagiri K, Terao M, Maruyama T. RAPD-and *Act A* gene- typing of *Listeria monocytogenes* isolated of human listeriosis, the intestinal contents of cows and beef. Microbiol Immunol 2001; 45: 127-33.
190. Lawrence L, Gilmour A. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from poultry products and from the poultry-processing environment by Random amplification of polymorphic DNA and Multilocus enzyme electrophoresis. App Environ Microbiol 1995; 61: 2139-44.
191. Wagner M, Maderner A, Brandl E. Random amplification of polymorphic DNA for tracing and molecular epidemiology of *Listeria* contamination in cheese plant. J Food Protection 1996; 59: 384-9.
192. Huang Y, Chen S, Wu M, Chen C, Hsieh WS, Tsao B, Horng C, Hsueh P. Molecular evidence for vertical transmission of listeriosis, Taiwan. J Med Microbiol 2006, 55:1601-3.
193. King H, Duncan J, Tracey P. Nosocomial transmission of listeriosis? Can Med Assoc J 1982; 126: 1374.
194. Hof H, Lampidis R, Bensch J. Nosocomial *Listeria* gastroenteritis in newborn, confirmed by Random amplification of polymorphic DNA. Clin Microbiol Infect 2000; 6: 683-6.

ABREVIATURAS

Act A	Proteína bacteriana Act A
ADN	Acido desoxirribonucleico
CAMP	Christhie, Atkins y Much-Peterson
CDTx	Toxinas dependientes de colesterol
Clp	Proteínas caseinolíticas
G+C	Glicina más citosina
Inl A	Internalina A
Inl B	Internalina B
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LLO	Listeriolisina O
LIPI-1	Islote patogénico de <i>Listeria</i> -1
LPM	Litio, feniletanol y moxalactam
LRR	Repeticiones ricas en leucina
MEC	Meningoencefalitis
Mpl	Metaloproteasa listerial
PALCAM	Polimixina, acriflavina, litio, ceftazidime, esculina y manitol
PBS	Buffer salino fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsátil
PLC-A	Fosfolipasa C –fosfatidil colina o tipo B
PLC-B	Fosfolipasa C –fosfatidil inositol o tipo A
Prf A	Factor regulador positivo tipo A
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RM /VP	Rojo de metilo / Voges Proskauer
TSA	Agar tripticasa soya
VASP	Proteína estimulante de la vasodilatación

FICHA CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICA

A. DATOS DE FILIACIÓN

1. N° de historia clínica de la madre:.....
2. N° de historia clínica del niño:.....
3. Edad de la madre:.....años
4. Distrito de procedencia de la madre:.....

B. DATOS DEL FETO O NEONATO

5. Producto de Gestación: Aborto () Óbito () RN vivo ()
6. Tipo de parto: Vaginal () Cesárea () Fecha:...../...../.....
7. Sexo y peso del RN Sexo:.....

C. DATOS DE LA ENFERMEDAD

8. Muestra del Aislamiento:
9. Grupo Poblacional : Gestante () Neonato ()
10. Signos y síntomas:
.....
11. Diagnósticos planteados:.....
.....
12. Complicaciones:.....
.....

D. COMENTARIOS

.....

...../...../.....
 Fecha

 Responsable

MEDIOS DE CULTIVO^{21,40.}

1. Agar bilis esculina

- Fundamento: Las listerias hidrolizan esculina, la cual forma un compuesto entre verde, castaño y negro, en presencia del iones férrico. La bilis inhibe del desarrollo de la flora acompañante.
- Composición:

-Extracto de carne.	3 g
-Peptona.	5 g
-Bilis de buey.	40 g
-Esculina.	1 g
-Citrato férrico.	0,5 g
-Agar.	15 g

⇒ pH final = 6,6 ± 0,2
- Preparación: Suspender 64,5 gramos de la mezcla en un litro de agua destilada y dejar reposar por 5 minutos. Calentar por ebullición hasta su completa disolución. Distribuir el medio en tubos estándar hasta un tercio de su altura. Esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 libras por 15 minutos. Dejar que el medio se solidifique en posición inclinada.

2. Agar motilidad

- Fundamento: Las listerias son bacterias móviles, migran de la línea de siembra y difunden en forma asimétrica (más en la superficie y menos en

la profundidad) en un medio semisólido a temperatura del ambiente. La turbidez del crecimiento bacteriano describe una imagen en “paraguas”.

- Composición:

-Triptefina	10 g
-Cloruro de sodio.	5 g
-Agar.	5 g

\Rightarrow pH final = $7,2 \pm 0,2$
- Preparación: Suspender 20 gramos de la mezcla en un litro de agua destilada y calentar por ebullición hasta disolver. Dispensar el medio en tubos estándar hasta un tercio de su altura. Esterilizar en autoclave a 121°C y 15 libras por 15 minutos. Dejar que el medio solidifique en posición vertical.

3. Agar tripticasa soya (TSA)

- **Fundamento.** El agar TSA es un medio primario para cultivo, transporte y preservación de listerias. La tripteína y peptona son fuentes de nitrógeno, la peptona también es fuente de carbono; mientras que, la sal mantiene el balance osmótico.
- **Composición:**

-Trypteína.	15 g
-Peptona.	5 g
-Cloruro de sodio.	5 g
-Agar.	15 g

⇒ pH final = 7,3 ± 0,2
- **Preparación:** Suspender 40 gramos de la mezcla en un litro de agua destilada y dejar reposar 5 minutos. Calentar hasta ebullición, agitando siempre para su disolución completa. Distribuir en placas y/o tubos y

esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 libras por 15 minutos. Dejar solidificar.

4. Agar sangre de carnero al 5%

- Fundamento: El agar sangre de carnero es un medio útil para diferenciar listerias según su capacidad hemolítica (sólo tres especies son hemolíticas). La hemólisis es amplia en *L. ivanovii*, pero discreta en *L. monocytogenes*. No obstante, la reacción de CAMP con *S. aureus* es positiva para *L. monocytogenes*, pero negativa para *L. ivanovii*.
- Composición (Agar Base):

-Infusión corazón vacuno.	375 g
-Peptona.	10 g
-Cloruro de sodio.	5 g
-Agar.	15 g

⇒ pH final = 7,3 ± 0,2
- Preparación: Suspender 40 gramos de la mezcla en un litro de agua destilada y dejar reposar 5 minutos. Calentar hasta ebullición y agitar para su disolución completa. Dejar enfriar y distribuir en volúmenes de 95 mL. Autoclavar a 121 °C y 15 libras por 20 minutos. Enfriar a 45-50 °C y añadir asépticamente 5 mL de sangre de carnero estéril desfibrinada por cada 95 mL de agar base. Distribuir el medio en placas Petri.

5. Caldo fermentación de carbohidratos

- Fundamento: Las listerias utilizan carbohidratos en forma diferenciada. *L. monocytogenes* fermenta D-glucosa y L-ramnosa, pero no D-xilosa ni D-

manitol. *L. ivanovii* y *L. seeligeri* fermenta D-glucosa y D-xilosa, pero no L-ramnosa ni D-manitol. El medio utiliza un indicador de pH (púrpura de bromocresol) para detectar la presencia de ácido (color amarillo) por la degradación del carbohidrato.

- Composición (Caldo Base):

-Proteasa peptona.	10 g
-Extracto de carne.	1 g
-Cloruro de Sodio.	5 g
-Púrpura de bromocresol	0,02 g
⇒ pH final = 7,2 ± 0,2	

- Preparación: Suspender 16 g de la mezcla en un litro de agua destilada, calentar hasta ebullición, dejar enfriar y distribuir en volúmenes de 90 mL. Esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 libras por 15 minutos. Dejar enfriar y añadir asépticamente* 10 mL de solución del carbohidrato al 5% por cada 90 mL de caldo base. Distribuir el medio en tubos† hasta un tercio de su altura.

6. Caldo NaCl al 6,5 %.

- Fundamento: Las listerias son bacterias halotolerantes (5-45 g/L de NaCl). El crecimiento bacteriano en el medio salino al 6,5% se evidencia por el viraje al color amarillo (formación de productos ácidos) del púrpura de bromocresol.

- Composición: -Caldo cerebro corazón. 2,5 g

* El esterilizado debe ser por filtración, no por autoclavado: D-xilosa no soporta la T° del autoclave, aunque si lo hacen D-glucosa, L-ramnosa y D-manitol.

-Cloruro de sodio	6,5 g
-Púrpura de bromocresol	0,3 mL
-Agua destilada	100 mL
\Rightarrow pH final = $7,3 \pm 0,2$	

- Preparación: Mezclar y disolver los ingredientes en el agua destilada y calentar hasta ebullición. Esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 libras por 15 minutos. Distribuir en tubos de 5 mL.

7. Caldo rojo de metilo /Voges Proskauer

- Fundamento: Las listerias fermentan la glucosa produciendo productos finales ácidos y neutros. Las sustancias ácidas pueden ser detectadas en el medio cuando se añade rojo de metilo. La adición al medio del reactivo de Voges Proskauer (α -naftol + KOH) produce oxidación del carbinol, una sustancia neutra de la fermentación de glucosa.
- Composición:

-Peptona tamponada.	7 g
-Fosfato dipotásico	5 g
-Glucosa	5 g

\Rightarrow pH final = $6,9 \pm 0,2$
- Preparación: Suspender 17 gramos de la mezcla en un litro de agua destilada y calentar por ebullición para disolver. Dispensar el medio en tubos estándar hasta un tercio de su altura. Esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 libras por 15 minutos. Dejar enfriar antes de usar.

[†] Usar tapa rosca para que la dispersión de CO₂ y difusión de O₂ sean lentos.

8. Caldo tripticasa soya (TSB)

- Fundamento: El caldo TSA es un medio primario para el cultivo líquido de listerias. La tripteína y peptona aportan nitrógeno, la peptona carbono y la glucosa energía; mientras que, la sal mantiene el balance osmótico y el fosfato dipotásico actúa como buffer.
- Composición:

-Trypteína.	17 g
-Peptona de soya.	3 g
-Cloruro de sodio.	5 g
-Fosfato di potásico	2,5 g
-Glucosa	2,5 g

⇒ pH final = $7,3 \pm 0,2$
- Preparación: Suspender 30 gramos de mezcla en un litro de agua destilada y calentar por ebullición para disolver. Dispensar el medio en tubos estándar hasta un tercio de su altura. Esterilizar en autoclave a 121 °C y 15 libras por 15 minutos. Dejar enfriar antes de usar.

API *LISTERIA* ® (BioMérieux)¹⁶³

I. FUNDAMENTO

API *Listeria*® es un sistema de identificación que utiliza ensayos miniaturizados estandarizados y una base de datos específica. El set consta de una galería de 10 microtubos con substratos deshidratados que permiten la realización de ensayos enzimáticos (fermentación de azúcares). Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, bien espontáneos o bien provocados mediante la adición de reactivos. La lectura de las reacciones se realiza con una tabla de Identificación y su interpretación mediante la comparación de su perfil numérico.

II. PROCEDIMIENTO

a) Preparación de la galería

- Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir 3mL de agua destilada en los alvéolos del fondo para crear una atmósfera húmeda.
- Escribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara.
- Sacar una galería de su envase individual.
- Colocar la galería en la cámara de incubación.
- Tirar la bolsita anti-humedad.

b) Preparación del inóculo

- Abrir una ampolla (2 mL) del Medio de Suspensión API.
- Coger colonias de cultivos de 18-24 h con la ayuda de una pipeta.

-Realizar una suspensión (turbidez =1 de McFarland) y utilizar de inmediato.

c) Inoculación de la galería

- Repartir la suspensión bacteriana anterior en los tubos, sin formar burbujas.
- Llenar tubo y cúpula del ensayo DIM (100 µL) sin producir menisco convexo.
- Llenar sólo parte del tubo (50 µL) del resto de ensayos (ESC a TAG).
- Cerrar la cámara de incubación.
- Incubar de 18-24 horas a 36°C en condiciones aeróbicas.

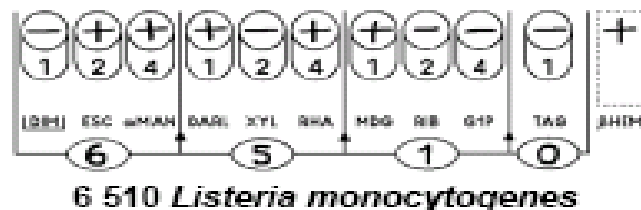
***La calidad del llenado es muy importante:** Los tubos excesiva o insuficientemente llenos pueden originar resultados falsos positivos o falsos negativos.

d) Lectura de la galería

- Agregar una gota del Reactivo ZYM B al ensayo DIM.
- Pasado los 3 min leer todas las reacciones.
- Anotar las reacciones como (+) o (-) en la hoja de resultados.
- Anotar el tipo de hemólisis, aunque no se considera en la interpretación.

e) Interpretación del resultado

- Determinar el perfil numérico: asignar el valor de 1, 2 ó 4 por cada ensayo (+) y sumar en cada grupo para obtener un número de 4 cifras.
- Identificación de *L. monocytogenes*: corresponde con el número **6 5 1 0**



GALERÍA FOTOGRÁFICA

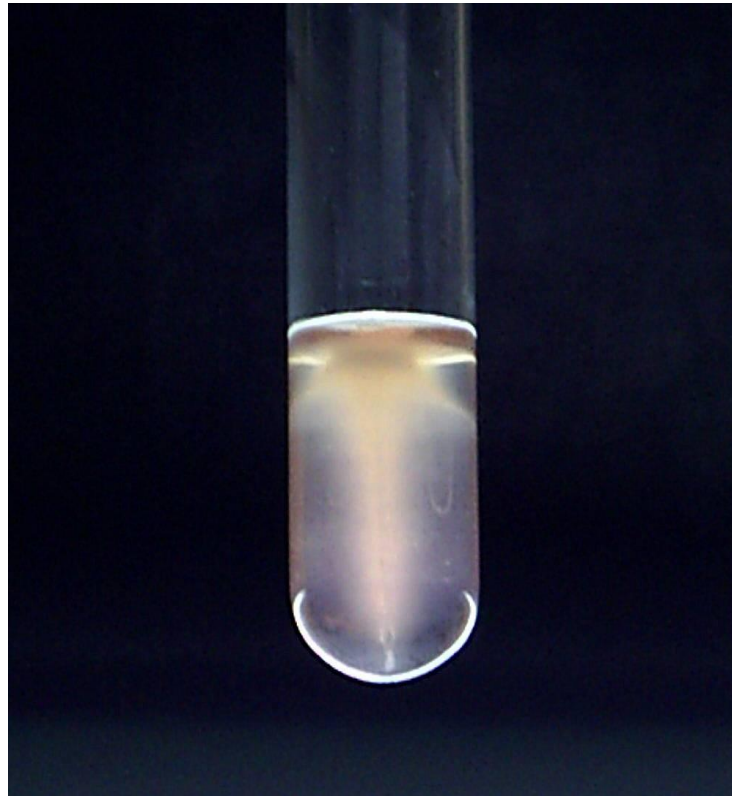


Foto A. Prueba de motilidad

Las listerias crecen formando un paraguas bajo la superficie del medio semisólido (agar motilidad) a temperatura ambiente (20-25 °C).

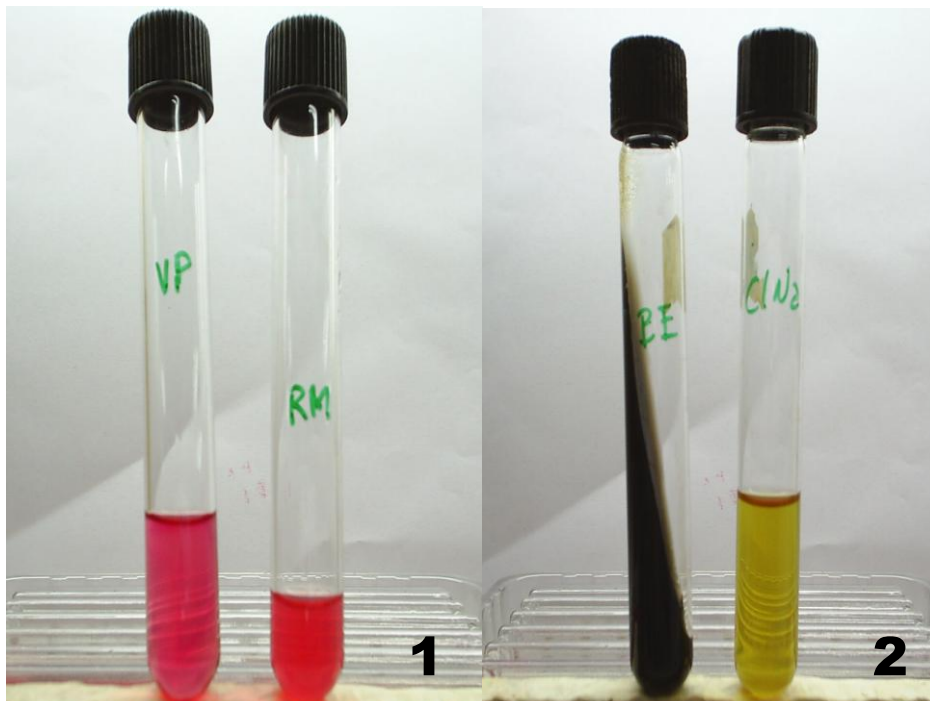


Foto B. Rojo de metilo /Voges Proskauer (1) y tolerancia a la bilis y sal (2)

Los cultivos de listerias tienen reacción positiva (viraje del medio al rojo) con los reactivos de Voges Proskauer y rojo de metilo (1). Además, crecen sobre agar bilis esculina (viraje al color oscuro) y sobre caldo NaCl 6,5% (color amarillo) (2).

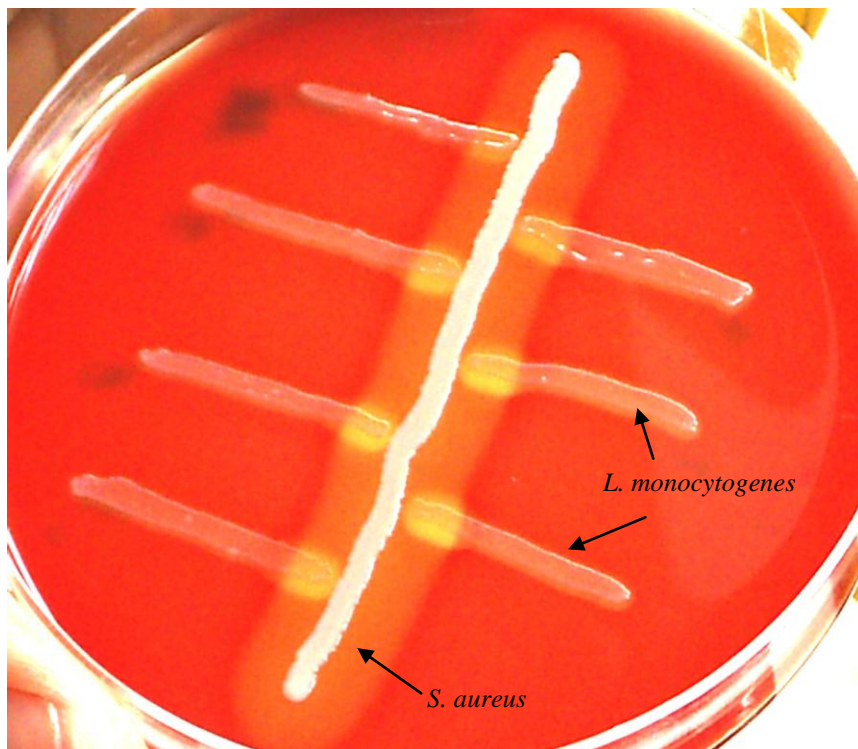


Foto C. Reacción de CAMP

La β -hemólisis de los cultivos de *L. monocytogenes* son potenciados por la toxina presente en los cultivos de *S. aureus* (reacción de CAMP positiva).

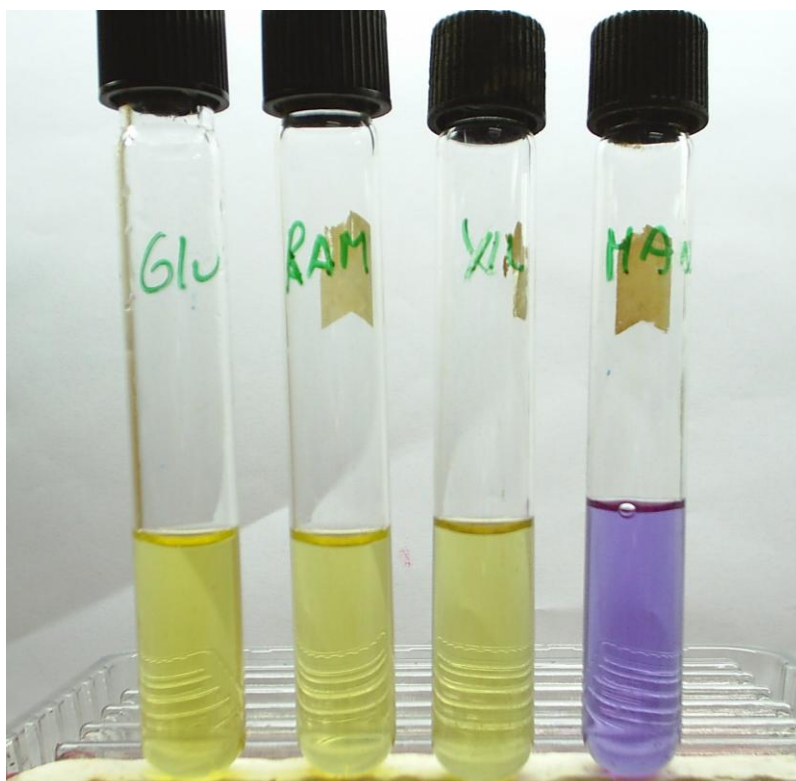


Foto D. Fermentación de Carbohidratos

Los cultivos de *L. monocytogenes* utilizan D-glucosa y L-ramnosa (color amarillo), pero no fermentan ni D-xilosa, ni D-manitol (color púrpura). En la foto se observa una reacción falsa positiva de D-xilosa cuando el medio se esteriliza por calor y no por filtración.

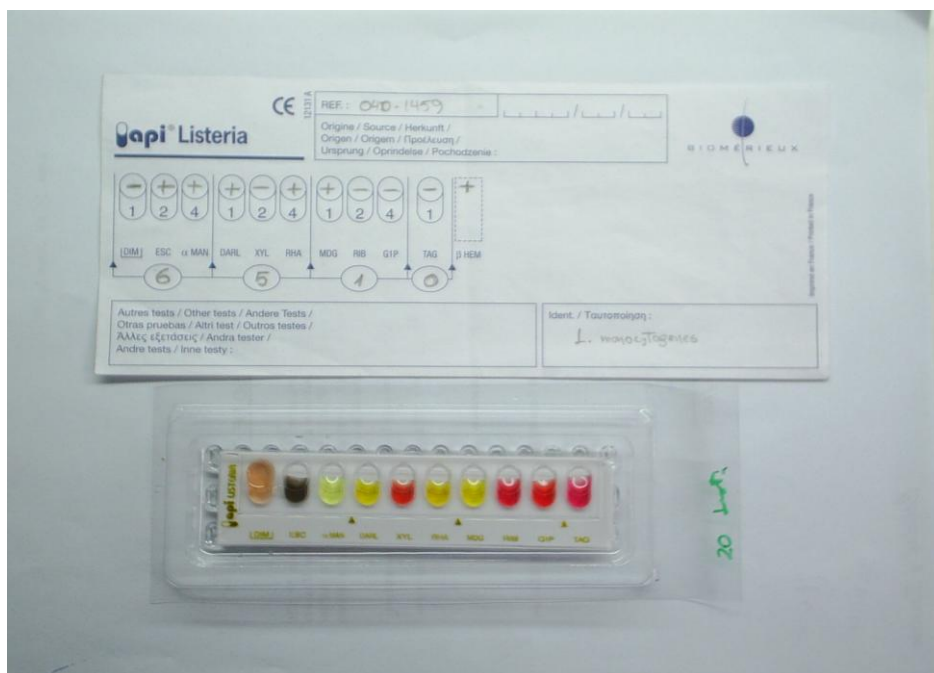


Foto E. Sistema API *Listeria*

El sistema API *Listeria*® (Laboratorios BioMérieux) permite una identificación sencilla, rápida y precisa de *L. monocytogenes* mediante el uso simultanea de 10 mini ensayos bioquímicos estandarizados.